

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Parasitología



Contribución a la Biología e Inmunología de *Toxocara canis*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María del Rocío Bardon Iglesias

Director

José Luis Guillén Llera

Madrid

ISBN: 978-84-8466-814-5

© María del Rocío Bardon Iglesias, 1992

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

**CONTRIBUCION A LA BIOLOGIA E
INMUNOLOGIA DE Toxocara canis**

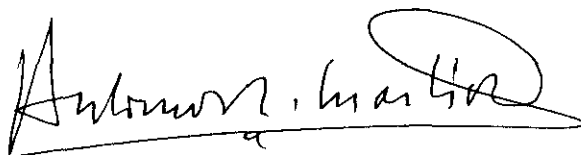
**MEMORIA que presenta para optar a
la colación del Grado de Doctor en
Farmacia, la Licenciada M^a del Rocío
Bardón Iglesias**

MADRID, 1.992

D. ANTONIO RAMON MARTINEZ FERNANDEZ, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA: Que la Memoria titulada "CONTRIBUCION A LA BIOLOGIA E
INMUNOLOGIA DE TOXOCARA CANIS" presentada por la Licenciada en
Farmacia M^a del ROCIO BARDON IGLESIAS para optar al Grado de Doctor en
Farmacia, ha sido realizada bajo la dirección de los Doctores D. JOSE
LUIS GUILLEN LLERA y D^a M^a del CARMEN DEL AGUILA DE LA PUENTE en este
Departamento de Parasitología

y para que así conste, expido y firmo el presente en Madrid a treinta
de septiembre de mil novecientos noventa y dos.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Antonio R. Martínez Fernández', with a large, stylized flourish at the end.

Fdo.: Dr. D. Antonio R. Martínez Fernández

A mis padres.

A Antonio.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Antonio R. Martínez Fernández, por haberme admitido en el Departamento para la realización de este trabajo, así como por la ayuda y consejos prestados en todo momento.

De un modo muy especial quiero resaltar mi agradecimiento a mis Directores de Tesis, Prof. Dr. D. José Luis Guillén Llera y Dra. D^a M^a del Carmen del Aguila de la Puente, por iniciarme en la investigación y por sus consejos y estímulo a lo largo de este tiempo; así como a las Dras. D^a M^a del Carmen Cuéllar y del Hoyo y D^a Soledad Fenoy Rodríguez, por su intervención directa en el trabajo y su ayuda en la elaboración de esta memoria. Sin ellos, no hubiera sido posible la realización de esta Tesis.

Agradezco asimismo, sinceramente, el apoyo y la colaboración de todos los profesores del Departamento: Dr. D. Luis Zapatero Ramos, Dr. D. Angel Sánchez-Covisa Villa, Dr. D. Francisco Bolás Fernández, Dra. D^a Carmen Cuesta Bandera, Dra. D^a Alicia Gómez Barrio, Dr. D. José Antonio Escario García-Trevijano, Dra. D^a Mercedes Martínez Grueiro, Dra. D^a Catalina Castaño Fernández y D. Juan Atienza Serna, pues siempre encontré en todos ellos colaboración y asesoramiento cuando me fue necesario.

Tampoco quiero dejar de expresar mi agradecimiento a compañeros como Pilar Domínguez López, M^a Isabel Jiménez Alonso, M^a del Mar Siles Lucas, Francisco Ponce Gordo, Nieves Sánchez Gumiel y a todos los que me ofrecieron su amistad y ayuda a lo largo de estos años, que para mí han sido muy importantes.

Quiero agradecer la participación de la Dra. D^a Dolores Veiga Ochoa, del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la U.C.M., por proporcionarme una formulación ensayada en este trabajo y por asesorarme sobre la misma.

A mis padres y hermanos, por su paciencia y ayuda, así como por su constante estímulo para concluir esta Tesis.

A mi marido, quien ha vivido muy de cerca todo este trabajo, animándome y participando directamente en la presentación del mismo.

A todos aquellos que de una forma u otra han colaborado en el desarrollo de la Tesis: MUCHAS GRACIAS.

INDICE

INDICE

1.- INTRODUCCION	1
2.- REVISION BIBLIOGRAFICA	7
2.1.- Posición Taxonómica	9
2.2.- Morfología	11
2.2.1.- Huevos	11
2.2.2.- Larvas	12
2.2.3.- Adultos	15
2.3.- Ciclo biológico	17
2.3.1.- Ciclo en cachorros	17
2.3.2.- Ciclo en perros adultos	18
2.3.3.- Ciclo en el hospedador paraténico	21
2.4.- Prevalencia en el hospedador definitivo	23
2.5.- Prevalencia en suelos	31
2.6.- Embrionamiento de huevos	37
2.7.- Métodos de recuperación larvaria	43
2.7.1.- Recuperación larvaria a partir de tejidos	43
2.7.1.1.- Métodos clásicos	43
2.7.1.1.1.- Método de Baermann	43
2.7.1.1.2.- Digestión péptica	45
2.7.1.1.3.- Método del "spin"	50
2.7.1.1.4.- Digestión salina	51
2.7.1.2.- Otros métodos	51
2.7.2.- Recuperación larvaria a partir de cavidades	54
2.8.- Migración larvaria en animales de laboratorio	57
2.9.- Eclosión de huevos embrionados y obtención de larvas viabiles	73
2.10.- Obtención de antígenos	79
2.10.1.- Obtención de antígeno total	79
2.10.1.1.- Antígeno total de huevos embrionados	79
2.10.1.2.- Antígeno total larvario	80
2.10.1.3.- Antígeno total de adultos	81
2.10.2.- Obtención de antígeno excretor-secretor larvario.....	82
2.11.- Obtención de anticuerpos anti-idiotipo.....	87
2.12.- Inmunidad	95
2.12.1.- Técnicas de diagnóstico inmunológico	95

2.12.1.1.- Técnicas que detectan la inmunidad humoral	95
2.12.1.1.1.- Detección de anticuerpos	95
2.12.1.1.2.- Detección de inmunocomplejos circulantes.....	114
2.12.1.1.3.- Detección de antígenos circulantes.....	115
2.12.1.2.- Técnicas que detectan la inmunidad celular	116
2.12.2.- Respuesta inmunitaria en animales de laboratorio	118
2.12.2.1.- Respuesta humoral	118
2.12.2.1.1.- Respuesta humoral en ratones	118
2.12.2.1.2.- Respuesta humoral en otros modelos animales.....	121
2.12.2.2.- Respuesta celular en ratones.....	124
2.12.3.- Protección	130
2.12.3.1.- Protección frente a <u>T.canis</u>	131
2.12.3.1.1.- Protección en el hospedador paraténico:	
animales de laboratorio.....	131
2.12.3.1.1.1.- Protección mediante infestaciones previas	
con huevos embrionados.....	131
2.12.3.1.1.2.- Protección mediante larvas irradiadas	136
2.12.3.1.1.3.- Protección mediante antígenos	
parasitarios	137
2.12.3.1.1.3.1.- Protección mediante extractos	
antigénicos	137
2.12.3.1.1.3.2.- Protección mediante antígenos de	
excreción-secreción larvaria	138
2.12.3.1.1.4.- Protección mediante transferencia	
de células o suero inmune	139
2.12.3.1.2.- Protección en el hospedador definitivo	139
2.12.3.2.- Protección frente a otros parásitos	
con anticuerpos monoclonales	140
2.13.- Tratamiento	147
2.13.1.- Tratamiento en animales de laboratorio	147
2.13.2.- Tratamiento de formas larvarias en el	
hospedador definitivo	152
2.13.3.- Tratamiento en el hombre	154
2.13.3.1.- Tratamiento de la Larva Migratoria Visceral	154
2.13.3.2.- Tratamiento de la Toxocarosis Ocular	158
3.- MATERIAL Y METODOS	161
3.1.- Material	163
3.1.1.- Material biológico	163

3.1.1.1.- Helminthos adultos	163
3.1.1.2.- Huevos	163
3.1.1.3.- Larvas de <u>T.canis</u>	163
3.1.1.4.- Antígenos	163
3.1.1.5.- Anticuerpos monoclonales.....	164
3.1.1.6.- Animales de experimentación	164
3.1.1.6.1.- Ratones	164
3.1.1.6.2.- Conejos	164
3.1.1.7.- Sangre de ratón	164
3.1.1.8.- Sueros	165
3.1.1.8.1.- Sueros de ratón	165
3.1.1.8.2.- Sueros de conejo	165
3.1.2.- Material de laboratorio	166
3.1.3.- Soluciones y reactivos	167
3.2.- Métodos	181
3.2.1.- Obtención de huevos	181
3.2.1.1.- A partir de heces	181
3.2.1.1.1.- Método de Bailenger	181
3.2.1.1.2.- Gradiente constante de sacarosa	182
3.2.1.1.3.- Concentración mixta Bailenger-sacarosa.....	182
3.2.1.2.- A partir de hembras grávidas	182
3.2.2.- Embrionamiento de huevos	183
3.2.3.- Obtención de larvas	183
3.2.3.1.- Eclosión de huevos embrionados mediante perlas de vidrio	184
3.2.3.2.- Separación de larvas viables	184
3.2.3.2.1.- Purificación de larvas mediante solución semisaturada de sacarosa	184
3.2.3.2.2.- Purificación de larvas mediante separador de linfocitos	184
3.2.4.- Cultivo de larvas "in vitro".....	185
3.2.5.- Obtención de antígenos	185
3.2.5.1 - Obtención de antígeno excretor-secretor larvario	185
3.2.5.2 - Obtención de antígeno total larvario	186
3.2.5.3 - Obtención de antígeno total de adultos	186
3.2.6.- Concentración de antígeno excretor-secretor larvario	187
3.2.7.- Determinación de la cantidad de proteínas:	
Método de Bradford	188

3.2.7.1.- Microensayo	188
3.2.7.2.- Macroensayo	188
3.2.8.- Pautas de inoculación	189
3.2.8.1.- Pautas de inoculación en ratones	189
3.2.8.1.1.- Inoculación con huevos embrionados	189
3.2.8.1.2.- Inoculación con antígeno total de adultos	189
3.2.8.1.3.- Inoculación con antígeno excretor-secretor larvario	190
3.2.8.1.4.- Inoculación con el anticuerpo monoclonal TC-1 ...	191
3.2.8.2.- Inoculación a conejos con el anticuerpo monoclonal TC-1	192
3.2.9.- Pautas de tratamiento a ratones con Mebendazol	192
3.2.10.- Método de recuperación larvaria	193
3.2.10.1.- Disección	194
3.2.10.2.- Homogeneización	194
3.2.10.3.- Digestión	195
3.2.10.4.- Tamizado	195
3.2.10.5.- Recuento larvario	196
3.2.11.- Investigación de larvas en la cavidad peritoneal	196
3.2.12.- Obtención de sangre y sueros	197
3.2.13.- Recuento de eosinófilos	197
3.2.14.- Preparación de los anticuerpos monoclonales	198
3.2.14.1.- Descongelación de células	198
3.2.14.2.- Mantenimiento del hibridoma	198
3.2.14.3.- Producción de ascitis	199
3.2.15.- Purificación de inmunoglobulinas	199
3.2.15.1.- Precipitación con ácido caprílico	199
3.2.15.2.- Precipitación con sulfato amónico	200
3.2.16.- Determinación de la concentración de inmunoglobulinas ..	201
3.2.17.- Conjugación del anticuerpo monoclonal TC-1 con biotina	201
3.2.18.- Método E.L.I.S.A	202
3.2.18.1.- Determinación de anticuerpos	202
3.2.18.2.- Determinación de inmunocomplejos	203
3.2.18.3.- Detección del anticuerpo monoclonal TC-1 en suero de conejo	205
3.2.19.- Obtención de anticuerpos anti-idiotipo frente al anticuerpo monoclonal TC-1	206

3.2.19.1.- Obtención de los fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo monoclonal TC-1	206
3.2.19.2.- Aislamiento, caracterización y purificación de los fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo monoclonal TC-1 ..	208
3.2.19.3.- Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	209
3.2.19.3.1.- Preparación del gel de resolución	209
3.2.19.3.2.- Preparación del gel de concentración	209
3.2.19.3.3.- Preparación de las muestras	210
3.2.19.3.4.- Aplicación de las muestras	210
3.2.19.3.5.- Desarrollo de la electroforesis	211
3.2.19.3.6.- Tinción de los geles	211
3.2.19.3.7.- Secado de los geles	212
3.2.19.4.- Pauta de inmunización de los conejos	212
3.2.19.5.- Sangrado de los conejos	212
3.2.19.6.- Purificación de los anticuerpos anti-idiotipo por cromatografía de afinidad	213
3.2.19.6.1.- Columna de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno y acoplada a inmunoglobulinas de ratón	213
3.2.19.6.1.1.- Montaje de la columna y acoplamiento de inmunoglobulinas de ratón	214
3.2.19.6.1.2.- Aplicación del suero de conejo	215
3.2.19.7.- Aislamiento de las inmunoglobulinas IgG del suero anti-idiotípico mediante columna de Proteína A - Sepharosa 4B	216
3.2.20.- Caracterización de los anticuerpos anti-idiotipo	217
3.2.20.1.- Estudio de la actividad anti-isotípica	217
3.2.20.2.- Estudio de la actividad anti-idiotípica	218
3.2.20.3.- Estudio de la semejanza estructural entre los anticuerpos anti-idiotipo y el antígeno excretor-secretor larvario	218
3.2.20.3.1.- Estudios de inhibición de la unión del anticuerpo idiográfico (anticuerpo monoclonal TC-1) al antígeno excretor-secretor larvario ...	218
3.2.20.3.1.1. - Mediante E.L.I.S.A.	218
3.2.20.3.1.2. - Mediante microprecipitación larvaria	220

3.2.20.3.2.- Inducción de la formación de anticuerpos	
anti-anti-idiotipo	221
3.2.20.3.2.1.- Pauta de inmunización	221
3.2.20.3.2.2.- Sangrado	221
3.2.20.3.2.3.- Ensayo de unión al antígeno	
excretor-secretor larvario	221
3.2.20.3.3.- Posible utilización de los anticuerpos	
anti-idiotipo como réplica idiotípica del	
antígeno excretor-secretor larvario: Aplicación	
en la detección de anticuerpos específicos en	
suero murino mediante E.L.I.S.A.....	222
3.2.20.3.3.1.- Ensayos directos	222
3.2.20.3.3.2.- Ensayos de inhibición	222
3.2.21.- Tratamiento estadístico	223
3.2.21.1.- Estudio comparativo de cada muestra	223
3.2.21.2.- Comparación de dos muestras	225
4.- RESULTADOS	229
4.1.- Estudio de la migración larvaria de <u>T. canis</u>	231
4.1.1.- Estudio en hígado, pulmones, vísceras, patas traseras,	
canal y cerebro	231
4.1.1.1.- En ratones BALB/c	231
4.1.1.2.- En ratones C57BL/10	238
4.1.1.3.- Tratamiento estadístico	245
4.1.1.4.- Representación conjunta de la dinámica	
migratoria en ambas cepas	256
4.1.2.- Selección de órganos más representativos	259
4.1.2.1.- En ratones BALB/c	259
4.1.2.2.- En ratones C57BL/10	266
4.1.2.3.- Tratamiento estadístico	273
4.1.2.4.- Representación conjunta de la dinámica	
migratoria en ambas cepas	284
4.1.2.5.- Ampliación cronológica del estudio de migración	
larvaria en la cepa BALB/c	287
4.1.3.- Investigación de larvas en la cavidad peritoneal	297
4.1.4.- Respuesta inmunitaria eosinofílica	298
4.1.4.1.- En ratones BALB/c	298
4.1.4.2.- En ratones C57BL/10	298
4.1.4.3.- Tratamiento estadístico	299

4.1.4.4.- Representación conjunta	300
4.1.5.- Respuesta inmunitaria humoral	301
4.1.5.1.- En ratones BALB/c	301
4.1.5.2.- En ratones C57BL/10	302
4.1.5.3.- Representación conjunta	303
4.2.- Tratamiento con mebendazol	304
4.2.1.- Evaluación mediante recuperación larvaria	304
4.2.1.1.- Eficacia del tratamiento en fase hepato-pulmonar	304
4.2.1.1.1.- Lote Ia: Control	304
4.2.1.1.2.- Lote IIa: Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa	305
4.2.1.1.3.- Lote IIIa: Mebendazol en carboximetilcelulosa ...	307
4.2.1.1.4.- Lote IVa: Mebendazol en agua	309
4.2.1.1.5.- Lotes Va, VIa y VIIa: Mebendazol en dispersión sólida	311
4.2.1.1.6.- Tratamiento estadístico	317
4.2.1.1.7.- Representación conjunta de la carga parasitaria .	323
4.2.1.2.- Eficacia del tratamiento en fase miotrópica-neurotrópica	325
4.2.1.2.1.- Lote Ib: Control	325
4.2.1.2.2.- Lote IIb: Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa	326
4.2.1.2.3.- Lote IIIb: Mebendazol en carboximetilcelulosa ...	328
4.2.1.2.4.- Lote IVb: Mebendazol en agua	330
4.2.1.2.5.- Lotes Vb, VIb y VIIb: Mebendazol en dispersión sólida	332
4.2.1.2.6.- Tratamiento estadístico	338
4.2.1.2.7.- Representación conjunta de la carga parasitaria	344
4.2.2.- Evaluación mediante estudio de la respuesta inmunitaria humoral.....	346
4.2.2.1.- Estudio de anticuerpos	346
4.2.2.1.1.- Frente al antígeno excretor-secretor larvario ...	346
4.2.2.1.1.1.- Lote Ib: Control	346
4.2.2.1.1.2.- Lote IIb: Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa	347
4.2.2.1.1.3.- Lote IIIb: Mebendazol en carboximetilcelulosasa ..	348

4.2.2.1.1.4.- Lote IVb: Mebendazol en agua	349
4.2.2.1.1.5.- Lotes Vb, VIb y VIIb: Mebendazol en dispersión sólida	350
4.2.2.1.1.6.- Representación conjunta	353
4.2.2.1.2.- Frente al antígeno total larvario	354
4.2.2.1.2.1.- Lote Ib: Control	354
4.2.2.1.2.2.- Lote IIb: Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa	355
4.2.2.1.2.3.- Lote IIIb: Mebendazol en carboximetilcelulosaosa	356
4.2.2.1.2.4.- Lote IVb: Mebendazol en agua	357
4.2.2.1.2.5.- Lotes Vb, VIb y VIIb: Mebendazol en dispersión sólida	358
4.2.2.1.2.6.- Representación conjunta	361
4.2.2.2.- Estudio de inmunocomplejos	362
4.2.2.2.1.- Lote Ib: Control	362
4.2.2.2.2.- Lote IIb: Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa	363
4.2.2.2.3.- Lote IIIb: Mebendazol en carboximetilcelulosa ...	364
4.2.2.2.4.- Lote IVb: Mebendazol en agua	365
4.2.2.2.5.- Lotes Vb, VIb y VIIb: Mebendazol en dispersión sólida	366
4.2.2.2.6.- Representación conjunta	369
4.2.2.3.- Representación conjunta de la respuesta humoral	370
4.3.- Pruebas de protección con antígenos	371
4.3.1.- Recuperación larvaria	371
4.3.1.1.- Lote A1: Control de huevos	371
4.3.1.2.- Lote A2: Control de adyuvante	372
4.3.1.3.- Lote A3: Inmunización con antígeno total de adultos .	374
4.3.1.4.- Lote A4: Inmunización con antígeno excretor-secretor larvario	376
4.3.1.5.- Tratamiento estadístico	378
4.3.1.6.- Representación conjunta de la carga parasitaria	381
4.3.2.- Respuesta inmunitaria humoral	383
4.3.2.1.- Frente al antígeno total de adultos	383
4.3.2.1.1.- Lote A1: Control de huevos	383
4.3.2.1.2.- Lote A2: Control de adyuvante	384

4.3.2.1.3.- Lote A3: Inmunización con antígeno total de adultos	385
4.3.2.2.- Frente al antígeno excretor-secretor larvario	387
4.3.2.2.1.- Lote A1: Control de huevos	387
4.3.2.2.2.- Lote A2: Control de adyuvante	388
4.3.2.2.3.- Lote A4: Inmunización con antígeno excretor-secretor larvario	389
4.4.- Protección con el anticuerpo monoclonal TC-1	391
4.4.1.- Vida media del anticuerpo monoclonal TC-1 "in vivo"	391
4.4.2.- Pruebas de protección pasiva	394
4.4.2.1.- Lote B1: Control	394
4.4.2.2.- Lote B2: Inoculación del anticuerpo monoclonal el día -1	395
4.4.2.3.- Lote B3: Inoculación simultánea de anticuerpo monoclonal y huevos	397
4.4.2.4.- Tratamiento estadístico	399
4.4.2.5.- Representación conjunta de la carga parasitaria	401
4.5.- Obtención de anticuerpos anti-idiotipo frente al anticuerpo monoclonal TC-1	403
4.5.1.- Obtención y caracterización de fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo monoclonal TC-1	403
4.5.1.1.- Digestión del anticuerpo monoclonal TC-1	403
4.5.1.2.- Eliminación de las fracciones de bajo peso molecular	407
4.5.1.3.- Digestión de las fracciones seleccionadas	411
4.5.2.- Purificación de los anticuerpos anti-idiotipo por cromatografía de afinidad mediante inmunoglobulinas de ratón acopladas a columna de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno	413
4.5.2.1.- Primera purificación	413
4.5.2.1.1.- Muestra preliminar de suero	413
4.5.2.1.2.- Suero procedente del primer sangrado	417
4.5.2.2.- Segunda purificación	421
4.5.2.2.1.- Suero procedente del primer sangrado	421
4.5.3.- Aislamiento de las inmunoglobulinas IgG del suero anti-idiotípico mediante columna de Proteína A - Sepharosa 4B	422
4.5.4.- Caracterización de los anticuerpos anti-idiotipo	423

4.5.4.1.- Estudio de la actividad anti-isotópica	423
4.5.4.1.1.- Muestra preliminar de suero parcialmente purificada una vez	423
4.5.4.1.2.- Suero procedente del primer sangrado parcialmente purificado una vez	424
4.5.4.2.- Estudio de la actividad anti-idiotópica	425
4.5.4.2.1.- Muestra preliminar de suero parcialmente purificada una vez	425
4.5.4.2.2.- Suero procedente del primer sangrado parcialmente purificado una vez	427
4.5.4.3.- Representación gráfica de actividad anti-isotópica y anti-idiotópica	429
4.5.4.3.1.- Muestra preliminar de suero parcialmente purificada una vez	429
4.5.4.3.2.- Suero procedente del primer sangrado parcialmente purificado una vez	432
4.5.4.4.- Estudio de la semejanza estructural entre los anticuerpos anti-idiotipo y el antígeno excretor-secretor larvario	435
4.5.4.4.1.- Estudios de inhibición de la unión del anticuerpo idiotípico (anticuerpo monoclonal TC-1) al antígeno excretor-secretor larvario	435
4.5.4.4.1.1.- Mediante E.L.I.S.A.	435
4.5.4.4.1.2.- Mediante microprecipitación larvaria	451
4.5.4.4.2.- Inducción de la formación de anticuerpos anti-anti-idiotipo: Ensayo de unión al antígeno excretor-secretor larvario	457
4.5.4.4.3.- Posible utilización de los anticuerpos anti-idiotipo como réplica idiotípica del antígeno excretor-secretor larvario: Aplicación en la detección de anticuerpos específicos en suero murino mediante E.L.I.S.A.	459
4.5.4.4.3.1.- Ensayos directos	459
4.5.4.4.3.2.- Ensayos de inhibición	463
5.- DISCUSION	473
5.1.- Estudio de la migración larvaria de <u>T. canis</u>	475
5.1.1.- Estudio en hígado, pulmones, vísceras, patas traseras, canal y cerebro	475

5.1.2.- Selección de los órganos más representativos	483
5.1.3.- Investigación de larvas en la cavidad peritoneal	486
5.1.4.- Respuesta inmunitaria eosinofílica	488
5.1.5.- Respuesta inmunitaria humoral	492
5.2.- Tratamiento con mebendazol	493
5.2.1.- Evaluación mediante recuperación larvaria	493
5.2.1.1.- Eficacia del tratamiento en fase hepato-pulmonar	493
5.2.1.2.- Eficacia del tratamiento en fase miotrópica-neurotópica	495
5.2.2.- Evaluación mediante estudio de la respuesta inmunitaria humoral	500
5.2.2.1.- Estudio de anticuerpos	500
5.2.2.2.- Estudio de inmunocomplejos	502
5.3.- Pruebas de protección con antígenos	505
5.3.1.- Respuesta inmunitaria humoral	505
5.3.2.- Recuperación larvaria	506
5.4.- Protección con el anticuerpo monoclonal TC-1	509
5.4.1.- Vida media del anticuerpo monoclonal TC-1	509
5.4.2.- Pruebas de protección pasiva	509
5.5.- Obtención de anticuerpos anti-idiotipo frente al anticuerpo monoclonal TC-1	513
5.5.1.- Obtención del suero anti-idiotípico	514
5.5.2.- Purificación y caracterización de los anticuerpos anti-idiotipo	517
5.5.2.1.- Estudio de las actividades anti-isotípica y anti-idiotípica	517
5.5.2.2.- Estudio de la semejanza estructural entre los anticuerpos anti-idiotipo y el antígeno excretor-secretor larvario	519
5.5.2.2.1.- Estudios de inhibición de la unión del anticuerpo idiotípico al antígeno excretor-secretor larvario	519
5.5.2.2.2.- Inducción de la formación de anticuerpos anti-anti-idiotipo	522
5.5.2.2.3.- Posible utilización de los anticuerpos anti-idiotipo como réplica idiotípica del antígeno excretor-secretor larvario	523

6.- CONCLUSIONES	527
7.- BIBLIOGRAFIA	531

INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION

Desde que Paul Beaver (1.952) identificara por primera vez las larvas de Toxocara canis como el agente etiológico de la toxocarosis humana e introdujera el concepto de Larva Migratoria Visceral (L.M.V.), el nivel de conocimientos sobre la biología del parásito, espectro clínico de la enfermedad, técnicas de inmunodiagnóstico y prevalencia humana, ha experimentado un avance espectacular en tan sólo cuatro décadas. Hoy día se acepta que la toxocarosis humana es una de las infestaciones por helmintos más frecuentes en los países desarrollados.

T. canis es un nematodo ascárido que, en estadio adulto, parasita a los cánidos a nivel intestinal, eliminando con las heces sus formas de diseminación. Una vez que éstas alcanzan el estadio infestante, pueden llegar al hombre, convirtiéndose así este parásito en el principal agente causal de la toxocarosis humana. Desde el punto de vista clínico, ésta puede cursar como toxocarosis asintomática, síndrome de L.M.V., toxocarosis ocular (T.O.) y existen sospechas de una posible cuarta modalidad que se denominaría toxocarosis neurológica.

T. canis es muy común entre los cánidos y su supervivencia se ve fácilmente asegurada por un especial mecanismo de transmisión que SHOOP (1.991) define con el término de "Anfiparaténesis" y que combina la transmisión vertical, la hipobiosis y la paraténesis. Las larvas, que pueden permanecer durante períodos prolongados de tiempo en las hembras, se transmiten durante la gestación, vía placentaria, desde la madre, que actúa como hospedador paraténico, al neonato que actúa como hospedador definitivo, evitándose de este modo la muerte del hospedador, a diferencia de la verdadera paraténesis ligada al carnivorismo. Además, madre e hijo, se comportan como reservorio de formas infestantes el uno para el otro, pues las larvas tisulares de la primera infestan al hijo, y los huevos, larvas de cuarto estadio y adultos inmaduros que éste expulsa con heces y vómitos, sirven para infestar de nuevo a la madre.

Como consecuencia, el grado de contaminación ambiental es muy elevado, con formas de diseminación que embrionan fácilmente y permanecen viables durante mucho tiempo. Por otro lado, la proporción de perros domésticos es cada día más elevada, la atracción por los perros y su ambiente es

sobradamente conocida entre los niños, así como ciertos hábitos de éstos, entre los que destaca el de "pica". Todo ello construye una cadena epidemiológica que se traduce en una infestación altamente probable y que queda reflejada consecuentemente en las encuestas serológicas.

El mejor conocimiento sobre el parasitismo por T. canis y sus implicaciones en la salud humana no va acompañado por el establecimiento de métodos de control que sean totalmente útiles en la práctica. Las medidas profilácticas generales sólo resultan parcialmente eficaces, teniendo en cuenta además que las formas infestantes pueden alcanzar a todo tipo de población y que muchos pacientes con toxocarosis clínica nunca han tenido perro o gato, ni contacto directo con cachorros. La causa principal de la ubicuidad de T. canis en la naturaleza es su capacidad para transmitirse generacionalmente, por lo que cualquier método de control efectivo debe dirigirse a destruir al parásito en el reservorio, constituido principalmente por el cánido adulto. Para ello existen dos opciones claras: la administración de antihelmínticos larvicidas, capaces de terminar con las larvas tisulares, así como la inmunización capaz de provocar un efecto más prolongado, si bien no tan inmediato. Estas medidas, serían útiles no sólo para evitar la transmisión desde el perro al hombre, sino que además en sí mismas serían aplicables a la toxocarosis humana. En el perro adulto y en el hombre las larvas siguen el mismo ciclo entero-neumo-somático y los agentes quimioterápicos o protectores deben actuar al mismo nivel.

A la hora de diseñar estudios experimentales para el ensayo de antihelmínticos o vacunas, el modelo murino resulta, sin duda, el más asequible, idóneo y extrapolable. Por ello, nuestro primer objetivo ha consistido en estudiar en profundidad la migración larvaria de T. canis en dos cepas murinas perfectamente definidas (BALB/c y C57BL/10) fijando a continuación un modelo experimental controlado con una de ellas que sirva de instrumento para los estudios de protección y tratamiento. En lo que respecta a éste, escogimos mebendazol como el quimioterápico a ensayar, conocida su relativa eficacia sobre otras helmintosis, planteándonos comprobar sus efectos tanto sobre la carga parasitaria total de los animales ensayados como sobre la distribución de las larvas en los órganos estudiados.

En cuanto a la protección, las infestaciones previas con huevos embrionados inducen una cierta resistencia a la infestación por T. canis.

aún cuando no hay consenso en el número necesario y se plantea el problema de la posible inmunosupresión con dosis única. En cualquier caso la inmunidad obtenida mediante este sistema no tendría nunca valor práctico dada la imposibilidad demostrada de eliminar los parásitos remanentes, como consecuencia de la pauta utilizada en la inmunización. Por ello, hemos diseñado nuestros ensayos probando extracto antigénico de adultos y antígeno excretor-secretor larvario (E/S).

En otros modelos parasitarios, se han realizado ensayos sobre transferencia pasiva de inmunidad "in vivo" mediante anticuerpos monoclonales, consiguiendo buenos niveles de protección. En nuestro caso, hemos ensayado la capacidad de protección pasiva del anticuerpo monoclonal TC-1 que, en ensayos previos de especificidad "in vitro" mediante microprecipitación larvaria, había resultado no sólo específico sino además tóxico para las larvas de T. canis.

Por último y dado el conocimiento actual sobre la red idiotípica y su importancia en la regulación de la respuesta inmunitaria, hemos diseñado un protocolo basado en la disponibilidad de un anticuerpo monoclonal (Ab1) que ya había mostrado su capacidad en pruebas de protección pasiva, para obtener un anticuerpo anti-idiotipo (Ab2) capaz de mimetizar algún determinante del antígeno E/S. Tal proyección podría llevar a la utilización de este segundo anticuerpo como sustitución del antígeno E/S y como elemento de captura en las pruebas de diagnóstico mediante enzimoimmunoensayo. Para conocer si el Ab2 es capaz de producir anticuerpos específicos que se comportan y actúan como el Ab1, diseñamos otra experiencia con posterior inoculación con el fin de comprobar este extremo.

Todo lo anterior se justifica en función de la dificultad para obtener lotes homogéneos de antígeno E/S mediante técnicas de cultivo y del problema que plantea la posible existencia de cepas del parásito quizá con variabilidad en sus antígenos, así como por las discrepancias en el tipo y número de bandas que se obtienen al caracterizar dicho antígeno, pues aun cuando coinciden en las zonas de mayor homología, no son uniformes en los resultados obtenidos por los distintos autores. Por ello, la posible identificación de epítomos comunes e inmunodominantes en este sistema, es una vía lógica y consecuente para obtener un sistema diagnóstico homogéneo y reproducible que pueda homologarse en los distintos laboratorios, y que por

lo tanto permita normalizar los resultados, proporcionando de este modo un cuadro real de la prevalencia y, en consecuencia, de la importancia de la toxocarosis humana.

REVISION
BIBLIOGRAFICA

2.- REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1.- POSICION TAXONOMICA

Phylum NEMATHELMINTHES

Clase NEMATODA

Subclase SECERNENTEA (PHASMIDIA)

Orden ASCARIDIDA Skrjabin, 1.915

Superfamilia ASCARIDOIDEA Railliet y Henry, 1.915

Familia ASCARIDIDAE Baird, 1.853

Subfamilia TOXOCARINAE (Hartwitch, 1.954) Osche, 1.958

Género: Toxocara Stiles, 1.905

Sinonimias: Belascaris Leiper, 1.907;

Neoascaris Travassos, 1.927

Especie: Toxocara canis (Werner 1.782) Stiles, 1.905

Sinonimias: Ascaris weneri Rudolphi, 1.973;

Ascaris marginata Rudolphi, 1.802

2.2.- MORFOLOGIA

2.2.1.- HUEVOS

Los huevos de T. canis son redondeados y miden, aproximadamente, 85-95 μm x 75-90 μm (SOULSBY, 1.982; QUIROZ, 1.984; BEAVER, 1.986). Son pegajosos, tienen una cubierta gruesa ornamentada, con pequeñas hendiduras o depresiones, y en su interior se encuentra la célula huevo globular que ocupa prácticamente la totalidad de la cavidad interna con un color oscuro uniforme.

Estos huevos se caracterizan por una gran capacidad de resistencia frente a ciertas acciones de tipo químico, mecánico y térmico, debido a la estructura de su cáscara (BORCHERT, 1.975).

La fertilización estimula inmediatamente la formación de esta cubierta, de cuyas cuatro capas, tres las forma el propio huevo y una cuarta es añadida por las secreciones del útero. En primer lugar aparece la capa vitelina y, por debajo, una capa quitinosa que va seguida de una tercera de naturaleza lipídica formada bajo la segunda por coalescencia de gránulos refringentes que salen del citoplasma. El material secretado por la pared del útero se adhiere a la superficie externa del huevo para formar la cuarta capa que, mientras el huevo está en el útero, mantiene un aspecto albuminoso e incoloro; sin embargo al entrar en contacto con la bilis en el flujo del contenido intestinal, se endurece y adquiere una coloración pardo-amarillenta.

Los estudios realizados por BOUCHET y LEGER (1.985), mediante microscopía electrónica, demuestran que la capa lipídica de BIRD (1.971) está formada por otras dos subcapas, denominadas granular y lamelar. Asimismo, los mencionados autores observan que el citoplasma del oocito está separado de la capa lamelar por el plasmolema y que entre estas estructuras se encuentran vesículas de tamaño variable, observando en el citoplasma numerosos ribosomas, bien libres, bien ligados al retículo endoplásmico, y diversos glóbulos y gránulos.

Los huevos infértiles presentan una forma más irregular y, generalmente, no tienen bien definidas sus capas ya que su formación está estimulada por la penetración de los espermatozoides en los oocitos (BEAVER y col., 1.986; PROCIV, 1.990).

2.2.2.- LARVAS

La larva de segundo estadio, que se forma por muda de la L1 dentro del huevo, es la forma infestante del parásito. Presenta dificultades en su identificación debido a la semejanza con las de otros helmintos, por lo cual dicha identificación se suele hacer a nivel histológico.

Las larvas infestantes presentan una longitud media de 404 μ m (360-434 μ m) por un diámetro, a nivel del esófago, de 18-21 μ m (NICHOLS, 1.956, a).

Por microscopía electrónica de barrido, VEGNI TALLURI y col. (1.986) observan que la superficie corporal de la larva se encuentra fuertemente estriada. La cavidad bucal, en posición subterminal y dorsalmente inclinada, está rodeada de tres labios desarrollados, los cuales están presumiblemente implicados en la recolección de alimento y el anclaje a los tejidos durante la migración. Ligeramente anterior a los labios se sitúa una cápsula bucal superficial, cuyo margen ventral está formado por una cutícula fina, espinosa y afilada y en el extremo anterior de la larva se encuentran las papilas cefálicas.

El aparato bucal se continúa en un esófago largo y ligeramente mazudo, que ocupa un tercio de la longitud total de la larva. A nivel del primer tercio del esófago se sitúa un anillo nervioso muy marcado, mientras que en la posición subterminal se encuentra la célula excretora que desemboca en un poro excretor, situado entre ambas estructuras y desplazado hacia la primera; toda la porción periesofágica está ocupada por abundantes núcleos ganglionares.

El esófago se prolonga en un intestino cilíndrico que desemboca en un ano situado en posición subterminal. El primordio genital se encuentra en el último tercio y adosado a la pared intestinal.

El extremo posterior de la larva es digitiforme, aguzado y ligeramente asimétrico. Posee también dos alas que aparecen como dos líneas refráctiles y que se extienden desde la boca al poro anal (terminan a unos 20 μ m del extremo final), así como dos pares de papilas, un par anterior al poro excretor y otro par detrás de la mitad del cuerpo, cerca del ala lateral.

- Aparato bucal. La cápsula bucal presenta un margen externo completo, con una cutícula que se continúa por la pared corporal y la línea cuticular del esófago. La cutícula del labio dorsal está aplicada sobre la superficie externa y los dos labios subventrales están separados del margen externo y se proyectan ligeramente hacia fuera.

Por microscopía electrónica de transmisión, VEGNI TALLURI y col. (1.986) observan tres proyecciones cuticulares separando la cavidad bucal de las cavidades del vestíbulo. Estas estructuras podrían funcionar como una válvula que se abre y se cierra, coordinándose con el movimiento de bombeo del sistema de alimentación, para prevenir la regurgitación del contenido del tracto alimentario. Este mecanismo puede estar soportado por unas fibras musculares que constituyen una gruesa capa al principio del esófago. Puesto que la capa cuticular que cubre estas proyecciones es más gruesa y aparentemente más fuerte que la cutícula adyacente de la cavidad vestibular, podría ser utilizada también como trituradora de alimento.

- Vestíbulo. Detrás de la cavidad bucal aparecen unas células vestibulares que ocupan un extenso área de la porción anterior del tracto digestivo, desde el vestíbulo hasta la región esofágica. Estas células ocupan el sector dorsal y subventral de la región vestibular-esofágica. Su principal característica es que forman un complejo sistema citoplásmico lamelar que está en estrecho contacto con la capa cuticular de la cavidad vestibular. Está formado por numerosas membranas plásmicas envolventes que dan origen a densos compartimentos. La fuerte similitud entre este aparato lamelar de las células vestibulares y las membranas de transporte epitelial indica que estas células podrían intervenir en la regulación osmótica e iónica (RHODIN, 1.958; BENTZEL y col., 1.969; BERRIDGE y OSCHMAN, 1.972; PEAKER y LINSELL, 1.975; GILLES y PEQUEAUX, 1.986).

La presencia de esta organización capacita a las larvas de T.canis para permitir las variaciones osmóticas por el material que ingieren

durante la migración. Las larvas atraviesan varias barreras tisulares, como la mucosa del intestino delgado, el hígado y las paredes alveolares de los pulmones. En estas localizaciones se ven expuestas a distintos ambientes, por lo que tienen que adaptarse a las diferentes condiciones osmóticas de los tejidos invadidos.

- Esófago. Ocupa, aproximadamente, un tercio de la longitud total de la larva, y se puede dividir en cuatro regiones: procorpus (20 μ m de longitud), metacorpus (35 μ m de longitud y 5 μ m de anchura), istmo (equivalente a procorpus y metacorpus juntos) y bulbo terminal (20-25 μ m de longitud y 6-10 μ m de anchura).

- Anillo nervioso. Aparece como una estructura clara y homogénea, cuyos márgenes están limitados por elementos celulares de la región media del esófago. Intimamente asociados al anillo nervioso y rodeando a casi todo el esófago, existen gran cantidad de núcleos ganglionares que separan la pared corporal de parte del procorpus y, totalmente, del metacorpus e istmo.

- Glándulas esofágicas. Existe una glándula dorsal bien definida y dos subventrales, situadas en la porción posterior del esófago. La dorsal consiste en una célula alargada que se extiende por el procorpus y tiene sus núcleos embebidos en la porción posterior del sector dorsal del bulbo. Tiene una cavidad intracitoplásmica cubierta por una capa cuticular gruesa, que se abre en el lumen del esófago. Los productos de secreción están formados por grandes inclusiones esferoidales. La secreción de la glándula dorsal tiene el mismo aspecto que la de las células de la glándula posterior, pero no se puede negar que tengan una función diferente.

La abundancia de retículo endoplásmico rugoso y la presencia de aparato de Golgi en el citoplasma de la célula de la glándula dorsal, indica que ésta interviene en la secreción de proteínas. Las secreciones de esta célula, así como las de las glándulas esofágicas posteriores, pueden, además de participar en el mecanismo de alimentación, estar implicadas en la secreción de enzimas histolíticos en el hábitat del hospedador, para facilitar la penetración de las larvas a través de los tejidos.

- Célula excretora. KONDO y col. (1.987), en un estudio de la célula excretora de T.canis por microscopía óptica combinada con tinción

inmunoenzimática, observan en realidad una pareja de células excretoras con forma ovalada en sección transversal y una pareja de columnas en sección longitudinal, tal como indica NICHOLS (1.956).

El citoplasma está lleno de numerosas estructuras circulares a modo de vesículas. Estas estructuras se observan más minuciosamente con tinción inmunoenzimática que con microscopía. Están formadas por numerosas vesículas con alta densidad a los electrones y poseen vesículas granulosas más pequeñas que miden, aproximadamente, 0,1-0,06 μm , y que pueden sobresalir o ser secretadas en el lumen de las vesículas grandes.

- Intestino. Aparentemente carece de lumen y está constituido por siete células alargadas cuyo citoplasma contiene gránulos opacos de grasa. El intestino está muy comprimido lateralmente por las columnas excretoras y posteriormente se expande y ocupa todo el cuerpo de la larva. La última célula intestinal termina 20-30 μm antes del poro anal, con el que se conecta por un fino tubo cuticular.

- Primordio genital. Es una pequeña masa situada entre el intestino y la pared corporal ventral, desde la porción anterior al nivel medio del intestino. La forman cuatro células que no son separables individualmente.

2.2.3.- ADULTOS

El cuerpo del adulto de T. canis es fuerte y blanquecino, con estriás transversales irregulares y alas cervicales estrechas y lanceoladas, que se extienden, desde la extremidad anterior, a lo largo de los márgenes laterales. Tiene los tres labios característicos de los ascáridos; presentan un bulbo formado por dos lóbulos laterales diferentes, separados por un canalículo, entre los cuales existe un lóbulo intermedio simple. Los lóbulos laterales se estrechan hacia la parte anterior, terminando en un proceso digitiforme que acaba en forma redondeada con pequeños dentículos. El orificio oral se abre en el centro de los labios y se continúa en un esófago de aspecto mazudo que presenta un bulbo posterior muscular (LEVINE, 1.980).

El macho tiene entre 4 y 6 cm de longitud por 2,5 mm de diámetro (SCHMIDT y ROBERTS, 1.984) con un extremo caudal curvado digitiforme, sin alas caudales, y con dos series de 20-30 papilas preanales sentadas, cinco papilas postanales a cada lado de la cola y una papila subventral doble a cada lado del ano, posterior a la cloaca. Presenta unas espículas ligeramente desiguales y curvadas, de 750-1.500 μ m de longitud y carece de gubernáculo.

La hembra mide de 6,5 a 15 cm de longitud por 2,5-3 mm de diámetro y su extremo posterior es romo. La vulva se sitúa en el cuarto anterior del cuerpo y cada puesta se estima en unos 200.000 huevos/día.

2.3.- CICLO BIOLÓGICO

En el caso de T. canis, además del perro doméstico, pueden actuar como hospedadores definitivos los cánidos salvajes.

Los huevos se expulsan vehiculados con las heces sin embrionar, precisando un periodo de desarrollo en el medio externo, que, en condiciones óptimas de humedad y temperatura ambiente, suele ser de unas dos semanas.

Los perros pueden adquirir la infestación mediante la ingestión de huevos embrionados, la mayoría de los cuales eclosionan en el duodeno entre las dos y las cuatro horas después de su ingestión.

2.3.1.- CICLO EN CACHORROS

La mayoría de los huevos infestantes eclosionan en el duodeno del cachorro entre las dos y cuatro horas después de su ingestión. Las larvas penetran la mucosa intestinal y, en los vasos linfáticos, atraviesan los nódulos linfáticos mesentéricos, desde los que continúan vía capilares venosos al sistema portal-hepático. Algunas larvas migran directamente a los capilares mesentéricos y, desde éstos, al hígado. La mayoría de las larvas alcanzan el hígado dos días después de la infestación, pasando posteriormente a los pulmones, vía vena hepática, corazón y arteria pulmonar, alcanzándose el máximo de larvas pulmonares entre los tres y cinco días postinfestación.

La mayoría de las larvas migran posteriormente a los alveolos y, de allí, vía bronquiolos y tráquea, hasta la faringe, desde donde son deglutidas, alcanzando el estómago hacia el décimo día de la infestación y sufriendo una muda.

Las larvas de cuarto estadio aparecen en el duodeno, aproximadamente, después de 14 días de la ingestión de los huevos, ocurriendo la muda al estadio adulto entre los 19 y 27 días, apareciendo los huevos unos 30-34 días postinfestación.

Los helmintos adultos pueden vivir aproximadamente cuatro meses en el intestino delgado y la mayoría se expulsa antes que el cachorro alcance los seis meses de edad.

Una pequeña cantidad de larvas en estos cachorros no llega a completar el ciclo hasta el estadio adulto, dado que desde los pulmones vuelven al corazón por la vena pulmonar y allí, a través de la circulación sistémica, se distribuyen por todo el organismo, localizándose en los distintos tejidos somáticos, sin posterior desarrollo.

2.3.2.- CICLO EN PERROS ADULTOS

Cuando los cachorros llegan al estadio adulto, se produce una disminución en la capacidad de las larvas para conseguir la migración traqueal. Es un número escaso de larvas el que pasa de los pulmones a la tráquea, puesto que la mayoría de ellas entran en la vena pulmonar y realizan una migración somática.

Estas larvas, que son distribuidas vía corazón y circulación sistémica a los tejidos somáticos, pueden alcanzar distintos órganos, tales como hígado, pulmones, riñones y cerebro de los perros adultos, unos ocho días después de la infestación, encontrándose su mayoría en músculo esquelético y riñones, al mes aproximadamente de la ingestión de los huevos.

En general, se pueden recuperar más larvas de los tejidos de las hembras que de los machos, encontrándose en ambos casos en el interior de los granulomas (excepto en cerebro), sin capacidad de desarrollo posterior. Teorías recientes apuntan la posibilidad de que el parásito reconozca el sexo del hospedador, ajustando su comportamiento en función del mismo, afirmando que los organismos hipobióticos parecen haber encontrado la proverbial "fuente de la juventud", permaneciendo como adolescentes durmientes en los tejidos, (SHOOP, 1.991).

Los mecanismos que permiten sobrevivir a las larvas en esta situación se desconocen actualmente, aunque es posible la existencia de una inmunomodulación de la respuesta del hospedador frente al parásito a cargo

de los productos de excreción-secreción presentes en los tejidos del hospedador y en el suero.

Por otro lado, en las perras preñadas las larvas somáticas que se encuentran latentes se reactivan en el interior del granuloma. Estas larvas, así como las procedentes de los huevos recién ingeridos, migran a través de la placenta hasta alcanzar el hígado fetal, resaltando el hecho de que alcanzan el hígado migrando a través de la sustancia del cordón umbilical más que por la ruta hematógica de la vena umbilical.

Algunas larvas no se reactivan y permanecen infestantes para otras nuevas camadas.

Por el momento no está claro si esta reactivación de las larvas somáticas es debida a una disminución de la inmunidad materna o a cambios hormonales asociados a la preñez. Las larvas que pasan de la madre al feto permanecen en el hígado fetal hasta el momento del nacimiento, en el cual comienzan su migración a los pulmones; sin que se conozca todavía la causa de dicha reestimulación.

Una vez en los pulmones, las larvas llevan a cabo la migración traqueal, mudando al cuarto estadio en los pulmones o en el estómago, durante la primera semana de vida del animal, para volver a mudar a los 14 días después del nacimiento, encontrándose adultos en el duodeno del cachorro, cuando éste alcanza los 21 días de vida.

Esta infestación prenatal de cachorros es extremadamente común y, probablemente, todos nacen infestados, desarrollando la mayoría una infestación patente. Por tanto, T. canis parece un llamativo ejemplo de parásito que ha desarrollado un mecanismo de explotación del ciclo reproductivo de su hospedador para su propia transmisión, ya que, en este ejemplo de hipobiosis, la maduración de las larvas coincide con la disponibilidad de los hospedadores neonatos para alcanzarlas. Esta combinación de transmisión vertical, hipobiosis y paraténesis es denominada por SHOOP (1.991) "Anfiparaténesis", definiendo este término como una transmisión de hospedador a hospedador, en la cual un parásito hipobiótico se transmite verticalmente desde la madre, que actúa como hospedador paraténico, al neonato, que actúa como hospedador definitivo; este mecanismo de

transmisión evita la muerte del hospedador a diferencia de la verdadera paraténosis, basada en el carnivorismo.

Los cachorros recién nacidos también pueden resultar infestados por transmisión transmamaria de larvas procedentes de la perra lactante. Las larvas reactivadas, así como las procedentes de huevos ingeridos durante la preñez, migran a las glándulas mamarias en las últimas etapas de la gestación o en la lactancia temprana.

Los cachorros adquieren el parásito por la ingestión de larvas infestantes con la leche, las cuales se desarrollan directamente al estadio adulto en el intestino. A pesar de todo, la transmisión transmamaria es relativamente poco importante si se la compara con la ruta prenatal; BURKE y ROBERSON (1.985) indican que el 98,5% de las infestaciones de los cachorros son prenatales y el 1,5% se realiza durante la lactancia.

Ocasionalmente se pueden encontrar huevos en las heces de las perras durante el parto como consecuencia de mecanismos distintos; puede tratarse de formas espúreas, debido a la ingestión de huevos presentes en las heces de sus cachorros, o de infestación patente por ingestión de larvas de cuarto estadio, o de adultos inmaduros que fracasan en su asentamiento intestinal y son expulsados con las heces o el vómito de los cachorros, pudiendo desarrollarse en el intestino de la perra. Asimismo, la depresión postparto de la respuesta inmune, o los mecanismos adaptativos desarrollados por el parásito, pueden permitir la maduración al estadio adulto de las larvas somáticas presentes en los tejidos de la perra y de las procedentes de los huevos ingeridos durante la preñez. En definitiva, la madre actúa como un reservorio de formas larvarias para el recién nacido y éste sirve de reservorio de formas adultas para volver a infestarla.

Se estima que, en estas circunstancias, las perras eliminan unos 15 millones de huevos al día, pero, en cualquier caso, tales infestaciones son eliminadas espontáneamente entre siete y 10 días después del destete.

2.3.3.- CICLO EN EL HOSPEDADOR PARATENICO

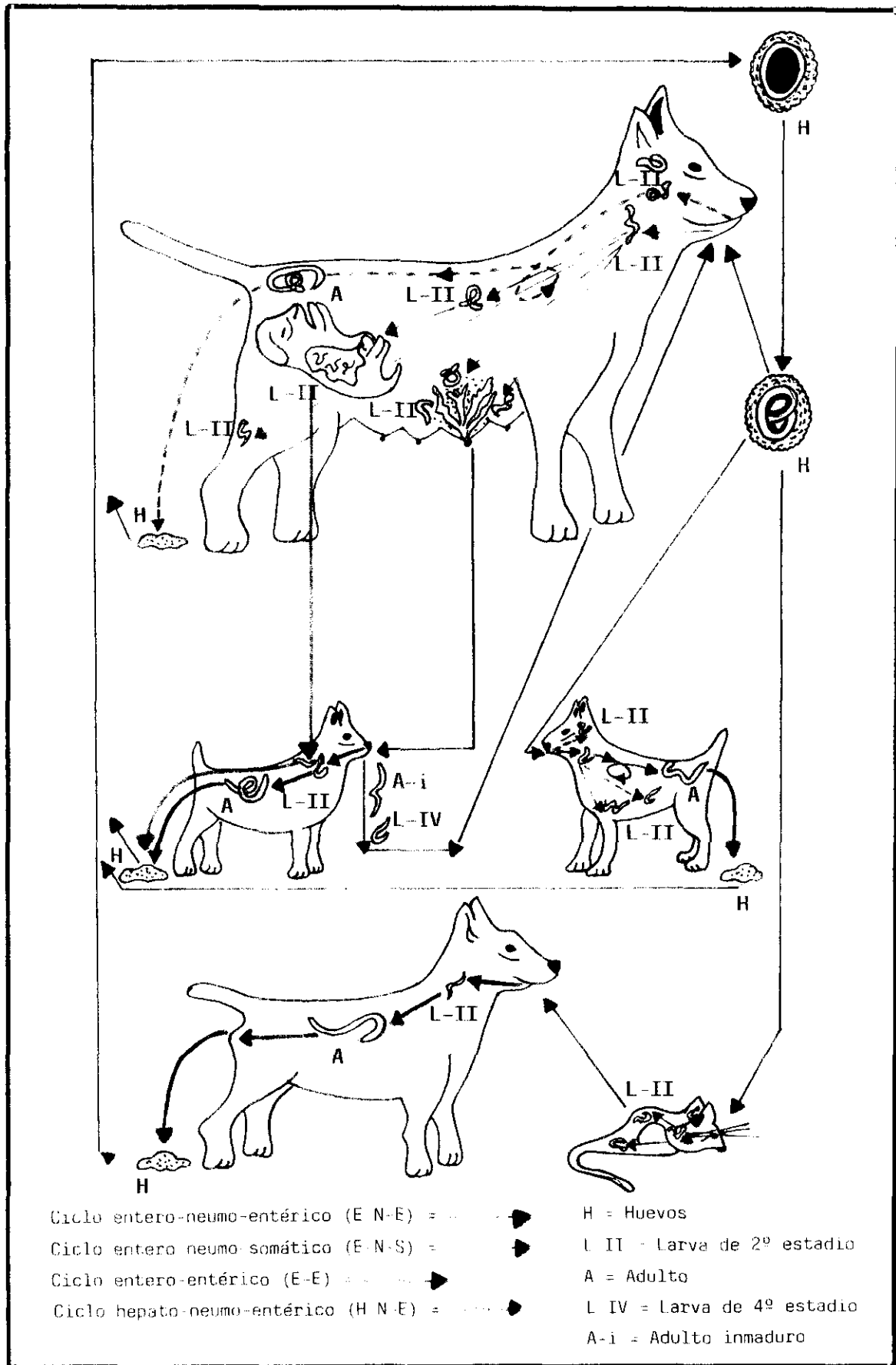
La última modalidad de infestación se basa en la depredación de hospedadores paraténicos que presentan estadios larvarios infestantes en sus tejidos.

Si se produce la ingestión de huevos infestantes por hospedadores paraténicos, tales como roedores, ovejas, vacas, cabras, monos, aves o seres humanos, las larvas llevan a cabo una migración somática a través de los distintos órganos y tejidos sin posibilidad de completar su desarrollo, permaneciendo vivas en el interior de los granulomas durante largos periodos de tiempo.

Cuando un perro u otro hospedador definitivo se alimenta de tejidos parasitados de dichos hospedadores paraténicos, las larvas son liberadas de los granulomas en la digestión, desarrollándose directamente al estadio adulto en el intestino, sin precisar migración previa, apareciendo los adultos a los 19 días postinfestación.

A pesar de que la infestación natural de roedores urbanos parece muy baja, la elevada prevalencia de infestaciones intestinales en los zorros adultos, sugiere que la vía paraténica podría tener gran importancia en determinadas comunidades salvajes.

CICLO BIOLÓGICO DE *Toxocara canis*



2.4.- PREVALENCIA EN EL HOSPEDADOR DEFINITIVO

A F R I C A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALI- DAD	NUMERO CASOS ESTUD.	TIPO DE MUESTRA	EDAD	% PARASI- TACION
Khalil y col.	1.976,a	Egipto	Dakahleia	200	Heces	---	50
Khalil y col.	1.976,b	Egipto	El Cairo	---	Heces	---	80
Khalil y col.	1.976,b	Egipto	Giza	---	Heces	---	0,82
Khalil y col.	1.976,c	Egipto	Oasis Siwa		Heces	---	68
Khalil y col.	1.976,c	Egipto	Oasis Quena	100	Heces	---	83
Khalil y col.	1.976,c	Egipto	Oasis Aswan		Heces	---	79
Khalil	1.977	Egipto	El Cairo		Heces	---	80,6
Khalil	1.977	Egipto	Giza	170	Heces	---	22,5
Khalil	1.977	Egipto	Mansoura	200	Heces	---	50
Packer y All	1.986	Libia	Trípoli	---	-----	---	2.1
Dada y col.	1.980	Nigeria	Kano State	150	-----	---	55,2
Fashuyi	1.981	Nigeria	Lagos	388	Heces	---	18,55
Arene	1.984	Nigeria	P. Harcourt	60	Intest.	---	56,66
Chiejina y Kwe	1.986	Nigeria	2 ciudades al Este	262	Heces	2-6 m. >24 m.	42,4 6,7
Aganga y col.	1.988	Nigeria	Zara	230	Heces	---	11,3
Schandevyl y col.	1.987	Zaire	Kinshasa	260	-----	---	35,4
Chartier y Chartier	1.990	Zaire	Bunia	62	-----	---	1,61

=====

ESTUD.= estudiados; Intest.= intestino; m.= meses.

A M E R I C A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALI- DAD	NUMERO CASOS ESTUD.	TIPO DE MUESTRA	EDAD TIPO	% PARASI- TACION
<u>América del Norte</u>							
Anvyk y col.	1.974	Canadá	Saskatoon	623	Heces	---	1,92
Ghadirian y col.	1.976	Canadá	Montreal	332	Heces	---	34
Malloy y Embil	1.978	Canadá	Darmouth Halifax	474	Heces	Cach. Adultos	56,1 11,9
Gualazzi y col.	1.986	Canadá	Halifax	181	Heces	---	12,7
Marron y Schroeder	1.978	U.S.A.	Los Angeles	182	Heces	2-6 m.	49,5
Herd	1.979	U.S.A.	Ohio	257	-----	<6 m.	40
Herd	1.979	U.S.A.	Ohio	428	-----	>6 m.	4
Stewart y col.	1.979	U.S.A.	Tarrant	100	-----	---	20
Surgan y col.	1.980	U.S.A.	Essex	246	-----	---	1,21
Paul y col.	1.988	U.S.A.	Illinois	40	Heces	---	5
<u>América Central</u>							
Saleh y col.	1.988	Antillas Holand.	Curaçao	133	-----	---	7,5
Robinson y col.	1.989	Jamaica	Kingston	141	Heces	---	8
<u>América del Sur</u>							
Chieffi y Muller	1.976	Brasil	Londrina	158	Heces y Autops.	---	44,3
Angelis Cortés y col.	1.988	Brasil	Sao Paulo	9.150	-----	---	11,70

=====

ESTUD.= estudiados; Autops.= autopsia; Cach.= cachorros; m.= meses.

A S I A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALI- DAD	NUMERO CASOS ESTUD.	TIPO DE MUESTRA	EDAD TIPO PROCED.	% PARASI- TACION
Gupta y col.	1.973	India	Calcuta	219	-----	---	3,6
Pal y col.	1.979	India	N. Delhi	137	Heces	Cach.	9,48
Samanta y col.	1.989	India	Banchi y alrededores	197	Heces	Callej. Domést.	38,03 11,91
Eslami y col	1.988	Irán	Alr.Teherán	110	Helmintos post-trat.	---	4,5
Eslami y col.	1.988	Irán	Alr.Teherán	50	Heces	---	45
Eslami y col.	1.988	Irán	Alr.Teherán	30	Autopsia	---	33
Gross y col.	1.984	Israel	Beersheba	---	-----	---	3
Glass y Kuhin	1.988	Israel	Tel Aviv	126	Heces	---	8,7
Kagei	1.976	Japón	Import. USA	30	-----	---	33,3
Matsumura y col.	1.981	Japón	Yamaguchi	25	-----	17-<4 m.	76
Matsumura y Endo	1.982,a	Japón	Yamaguchi	15	Heces Autopsia	Cach. Cach.	86,6 73,3
Abe	1.985	Japón	14 distritos	640	Heces	---	33,3
Ziyadeh	1.990	Jordania	----	---	Heces	---	17,9
Ziyadeh	1.990	Jordania	Amman	---	Heces	Urbana Rural	15,8 23,3
Ziyadeh	1.990	Jordania	Irbid	---	Heces	---	15,2
Ziyadeh	1.990	Jordania	Zarka	---	Heces	---	19,4
Ziyadeh	1.990	Jordania	Karak	---	Heces	---	20
Ziyadeh	1.990	Jordania	Salt	---	Heces	---	25
Rahman	1.990	Malasia	Penang	122	Heces	6 m.-5 a.	8,8

ESTUD.= estudiados; PROCED.= procedencia; Alr.= alrededores; Import.= importa-
dos; post-trat.= postratamiento; Cach.= cachorros; Callej.= callejeros;
Domést.= domésticos; m.= meses; a.= años.

A S I A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALI- DAD	NUMERO CASOS ESTUD.	TIPO DE MUESTRA	EDAD TIPO PROCED.	% PARASI TACION
Umar y col.	1.986	Pakistán	Lahore	150	Heces	Cach.	48,6
Umar y col.	1.986	Pakistán	Lahore	100	Heces	Adultos	30
Choo	1.987	Singapur	----	372	Heces	---	4,8
Hinz	1.980	Tailandia	Bangkok	107	Heces	---	6,5
Davidyants y Chobanyan	1.981	U.R.S.S. Armenia	Yerevan	---	-----	Callej.	36,5 - 42,8
Davidyants y Chobanyan	1.981	U.R.S.S. Armenia	Yerevan	---	-----	Pastor.	27,3 - 29,3
Davidyants y Chobanyan	1.984	U.R.S.S. Armenia	Yerevan	486	-----	Rurales	20,37
Davidyants y Chobanyan	1.984	U.R.S.S. Armenia	Yerevan	---	-----	Callej.	40
Davidyants y Chobanyan	1.984	U.R.S.S. Armenia	Yerevan	78	-----	Granj.	24,35

=====

ESTUD.= estudiados; PROCED.= procedencia; Cach.= cachorros; Callej.= calleje-
ros; Pastor.= pastores; Granj.= granjeros.

E U R O P A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALI- DAD	NUMERO CASOS ESTUD.	TIPO DE MUESTRA	EDAD TIPO PROCED.	% PARASI- TACION
Schaeffert y Strauch	1.979	Alemania	Stuttgart	---	Heces	---	9,3
Horchner y col.	1.981	Alemania	Berlín	605	Heces	---	3,5
Knaus y Betke	1.986	Alemania	----	5.002	Heces	2-36 m.	19,9
Sixl	1.975	Austria	Steimark	400	Heces	---	16,5
Gerin y col.	1.980	Bélgica	Bruselas	127	-----	---	1,7
Vanparijs y col.	1.991	Bélgica	----	2.324	Heces	---	17,4
Vanparijs y col.	1.991	Bélgica	----	212	Autopsia	---	38,9
Zurliiski	1.983	Bulgaria	----	26	-----	Domést.	42,3
Zurliiski	1.983	Bulgaria	----	11	-----	Pastores	27,2
Zurliiski	1.983	Bulgaria	----	6	-----	Callej.	50
Zurliiski	1.983	Bulgaria	----	6	-----	Callej. rurales	46,4
Zurliiski	1.983	Bulgaria	----	6	-----	Callej. urbanos	80
Soilev y col.	1.984	Bulgaria	Sofía Vidin	112	-----	Cach. urbanos	88,8
Soilev y col.	1.984	Bulgaria	Sofía Vidin	112	-----	Cach. callej.	96,2
Soilev y col.	1.984	Bulgaria	Sofía Vidin	112	-----	Cach. rurales	100
Vokoun	1.980	Checosl.	-----	4.050	-----	648 cach.	8,12
Klabanova	1.981	Checosl.	Praga	---	Heces	---	8,2

ESTUD.= estudiados; PROCED.= procedencia; m.= meses; Domést.= domésticos;
Callej.= callejeros; Cach.= cachorros.

E U R O P A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALI- DAD	NUMERO CASOS ESTUD.	TIPO DE MUESTRA	EDAD TIPO PROCED.	% PARASI- TACION
Kucharova	1.989	Checosl.	Praga	3.564	-----	---	9,6
Hindsbo y Mortensen	1.983	Dinamarca	-----	---		<1 año	20-30
Gallego y col.	1.952	España	Barcelona	---	-----	Vagab.	36,58
Jiménez Millán	1.959	España	Madrid	---	-----	Domést.	21,2
González Castro y col.	1.962	España	Navarra	---	-----	---	32
Guillén y Schez.Covisa	1.977	España	Madrid	400	Heces	---	12,5
Illescas y col.	1.985	España	Granada	136	-----	Perreras	2,9
Valladares y col.	1.985	España	Tenerife	314	Heces	Domést.	16,2
Valladares y col.	1.985	España	Tenerife	89	Heces	Perreras	4,4
Granados y col.	1.986	España	Granada	331	-----	---	11,81
Simón y Conde-García	1.987	España	Salamanca	400	Heces	---	31
Simón y Conde-García	1.987	España	Salamanca	---	Heces	<3 m. y Rural	88,4
Conde-García y col.	1.989	España	Salamanca	508	Heces	---	29,4-33,1
Ares Mazas y col.	1.988	España	Galicia	500	Heces	Rural Urbana Perreras	6,8 8,6 1,6
Kures y col.	1.980	Francia	Nancy	370	Heces	---	5,94

ESTUD.= estudiados; PROCED.= procedencia; Vagab.= vagabundos; Domést.= domés-
ticos; m.= meses.

E U R O P A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALI- DAD	NUMERO CASOS ESTUD.	TIPO DE MUESTRA	EDAD TIPO PROCED.	% PARASI- TACION
Feraud y col.	1.988	Francia	-----	160	Heces	1-3 a.	16.87
Petithory y Ardoin	1.990	Francia	---	500	Heces	---	2.6
Holt	1.976	G.Bretaña	Oldham	114 70	Heces Heces	Cach.desp. No desp.	33,33 67,14
Churcher	1.976	G.Bretaña	Hampshire	151	Heces	Callej.	7.28
Churcher	1.976	G.Bretaña	Hampshire	151	Heces	Domést.	8.60
Read y Thompson	1.976	G.Bretaña	Leeds	75	Heces	---	13.3
Edwards y col.	1.979	G.Bretaña	Gales	280	-----	Zorros	72,1
Balmer y col.	1.982	G.Bretaña	Gales	69	-----	Cazad.	13
Rep	1.980	Holanda	---	544	Heces	Adultos	14.5
Petithory y Ardoin	1.990	Italia	---	52	Heces	---	5.8
Tharaldsen	1.983	Noruega	Oslo	---	-----	---	0,5-4
Kozakiewicz	1.983	Polonia	Poznan	1.489	Heces	---	25,9
Arandas-Rego	1.980	Portugal	-----	100	Heces	<1 año >1 año	36,3 2.6
Christensson	1.988	Suecia	-----	---	-----	---	7
Guralp y col.	1.977	Turquía	Elazing	105	-----	---	44,76
Baiorinene	1.982	U.R.S.S. Lituania	Vilna	141	-----	Callej.	11,3
Yakubovich	1.982	U.R.S.S. Lituania	Vilna	115	-----	Adultos	10,4
Yakubovich	1.982	U.R.S.S. Lituania	Vilna	24	-----	Cach.	40,9

=====

ESTUD.= estudiados; PROCED.= procedencia; a.= años; Cach.= cachorros; desp.= desparasitados; Callej.= callejeros; Domést.= domésticos; Cazad.= cazadores.

O C E A N I A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALI- DAD	NUMERO CASOS ESTUD.	TIPO DE MUESTRA	EDAD TIPO PROCED.	% PARASI- TACION
Welch y col.	1.979	Australia	Queensland	653	-----	---	75
Boreham y Capron	1.982	Australia	Brisbane	---	-----	<1 año	35
Boreham y Capron	1.982	Australia	Brisbane	---	-----	>1 año	5
Boreham y Capron	1.982	Australia	Brisbane	---	-----	Adultos	1
Dodge y col.	1.980	N.Zelanda	Dunedin	147	Heces	---	2,8

=====

ESTUD.= estudiados; PROCED.= procedencia.

2.5.- PREVALENCIA EN SUELOS

A F R I C A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALIDAD	Nº CASOS ESTUD.	PROCEDENCIA ESTACION DEL AÑO	% DE CONTAMI- NACION
Khalil y col.	1.976,a	Egipto	Dakahleia	100	-----	10
Khalil y col.	1.976,a	Egipto	Mansoura	100	-----	10
Khalil y col.	1.978	Egipto	Cairo, Giza.	1.060	Verano	2,5-7,5
			Beni-Sweif.		Otoño	7,5-15
			Qualiabeya, Kafr El -Sheikh, Dakahleia y Damiett			
Madwar y col.	1.986	Egipto	Qalubiya	1.000	-----	8,9
Chiejina y Ekwe	1.986	Nigeria	2 ciudades al Este	100	Perreras	13
Umeche	1.989	Nigeria	Calabar	150	Pques. infant.	8
Woodruf y col.	1.981,a	Sudán	Jartum	---	-----	2,9
			Hilat Hamed	---	-----	0
			Juba	---	-----	32

=====

Nº.= número; ESTUD.= estudiados; Pques.= parques; infant.= infantiles.

A M E R I C A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALIDAD	Nº CASOS ESTUD.	PROCEDENCIA ESTACION DEL AÑO	% DE CONTAMI- NACION
<u>América del Norte</u>						
Ghadirian y col.	1.976	Canadá	Montreal	43	Pques. públ.	32,55
Ghadirian y col.	1.976	Canadá	Montreal	39	Pques. públ.	17,9
Viens	1.977	Canadá	Montreal	39	Pques. públ.	18
Gualazzi y col.	1.986	Canadá	Halifax	567	Areas recreo	2,3
Dada y Lindquist	1.979,a	U.S.A.	Manhatan	282	Pques. públ.	20
Dada y Lindquist	1.975,b	U.S.A.	Manhatan	232	Ciudad	22
Dada y Lindquist	1.975,b	U.S.A.	Manhatan	50	Otras áreas	8
Dada y Lindquist	1.975,b	U.S.A.	Manhatan	23	Jardines priv.	39
Surgan y col.	1.980	U.S.A.	N. Jersey	629	Pques. públ.	0,31
Smith y col.	1.984	U.S.A.	Baton R.	---	Pques. públ.	0,4
Childs	1.985	U.S.A.	Baltimore	146	-----	11
Paul y col.	1.988	U.S.A.	Illinois	135	Parques	16,3
Ludlam y Platt	1.989	U.S.A.	Benton Hb.	114	Parques	19
<u>América del Sur</u>						
Chieffi y Muller	1.978	Brasil	Londrina	15	Pques. públ.	60
Salinas y col.	1.987	Chile	Santiago	---	-----	10,77

=====

Nº.= número; ESTUD.= estudiados; Pques.= parques; públ.= públicos;
priv.= privados.

A S I A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALIDAD	Nº CASOS ESTUD.	PROCEDENCIA ESTACION DEL AÑO	% DE CONTAMI- NACION.
Min	1.978	Corea	Seúl	128	-----	89,8
Lee y col.	1.982	Corea	Kwangi	---	Parques	4,90
Lee y col.	1.982	Corea	Kwangi	---	Campos fútbol	7,90
Gunaseelan y col.	1.985	India	Madrás	527	Lugares públ. Parques	18,40 46,43
Woodruff y col.	1.981,b	Irak	Mosul	41	Parques	19,5
Woodruff y col.	1.981,b	Irak	Mosul	13	Pblos.límitrof.	4,6
Gross y col.	1.984	Israel	Beersheba	---	Parques	7
Uga y col	1.989	Japón	Hyago	227	Parques públ.	41,9
Abo-Shehada	1.989,a	Jordania	----	226	Pques. ciudades Zona rural Zona urbana	15 45 10,9
Ziyadeh	1.990	Jordania	----	---	Zona rural Zona urbana	15,7 12,7
Ziyadeh	1.990	Jordania	Amman	---	-----	11,8
Ziyadeh	1.990	Jordania	Irbid	---	-----	19,1
Ziyadeh	1.990	Jordania	Zarka	---	-----	12,3
Ziyadeh	1.990	Jordania	Karak	---	-----	16,2
Ziyadeh	1.990	Jordania	Salt	---	-----	12
Davidyants	1.982	U.R.S.S. Armenia	----	---	Zona urbana	42
Davidyants	1.982	U.R.S.S. Armenia	----	---	Zona rural	21,7
Shakarov y col.	1.988	U.R.S.S. Uzbekistán		156	-----	24,8

=====

Nº.= número; ESTUD.= estudiados; públ.= públicos; Pblos.= pueblos;
límitrof.= límites; Pques.= parques.

E U R O P A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALIDAD	Nº CASOS ESTUD.	PROCEDENCIA ESTACION DEL AÑO	% DE CONTAMI- NACION
Kholer y col.	1.980	Alemania	Berlín O.	320	Parques	1,87
Horchner y col.	1.981	Alemania	Berlín O.	90	Pques. infant.	3,33
Duwell	1.983,a	Alemania	Frankfurt y Main	31	Pques. infant.	87
Kasiecka	1.982	Austria	Viena	334	Parques	5,7
Zurliiski	1.983	Bulgaria	Varna	---	Calles	16,2
Rapic y col.	1.981	Yugoslav.	Zagreb	100	-----	27
Mikolasova y col.	1.981	Checosl.	Praga	975	Parques	17-31
Bozdech	1.981	Checosl.	Praga	975	Peq.pques.cent.	21,2
Bozdech	1.981	Checosl.	Praga	---	Gdes.pques.cent.	4,1
Bozdech	1.981	Checosl.	Praga	---	Pques. perifér.	5,4
Bozdech	1.981	Checosl.	Praga	---	Pques. infant.	10,3
Valkovnova	1.982	Checosl.	Praga	---	Pques. infant.	4,2
Angulo y col.	1.985	España	Madrid	175	Pques. públ.	8,57
Angulo y col.	1.985	España	Madrid	21	Zonas de entrenam.canino	47,6
Simón y Conde-García	1.987	España	Salamanca	60	Capital	6,6
Simón y Conde-García	1.987	España	Salamanca	202	Zona rural	13,3
Conde-García y col.	1.989	España	Salamanca	698	Capital Zona rural	3,7 9

Nº.= número; ESTUD.= estudiados; O.= Oeste; Pques.= parques; infant.= infantiles; Yugoslav.= Yugoslavia; Checosl.= Checoslovaquia; Peq.= pequeños; Gdes.= grandes; centr.= centrales; perifér.= periféricos; públ.= públicos; entrenam.= entrenamiento.

E U R O P A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALIDAD	Nº CASOS ESTUD.	PROCEDENCIA ESTACION DEL AÑO	% DE CONTAMI- NACION
Pegg	1.975	G.Bretaña	Londres	5.200	Area frecuentada por perros	5,2
Pegg	1.975	G.Bretaña	Londres	250	Jardines priv.	5,2
Read y Thompson	1.976	G.Bretaña	Leeds	14	Pques. públ.	7,14
Quinn y col.	1.980	G.Bretaña	Strathol.	234	Pques.y jard.	11,1
Snow y col.	1.987	G.Bretaña	Londres	503	Parques	66
Genchi y col.	1.989	Italia	-----	---	Pques. públ.	---
Moretti y Piergili Fioretti	1.989	Italia	Perugia	---	Pques. públ., zonas recreo, plazas,jardines	30
Tharaldsen	1.982	Noruega	Oslo	13	Guarderías	38,46
Arandas-Rego	1.980	Portugal	Lisboa	23	Pques. públ.	39,13
Baiorinene	1.982	U.R.S.S. Lituania	-----	587	Granjas y pques. infant.	9,5
Lenkauskaite y col.	1.982	U.R.S.S. Lituania	Vilna	34	-----	2,94
Lenkauskaite y col.	1.982	U.R.S.S. Lituania	Vilna	28	Area frecuentada por perros	14,28
Baiorinene y Balkjawiczius	1.988	U.R.S.S. Lituania	Vilna	---	Prox.vvdas.,pques. plzas,zon.juego	7,3
Gorash y Aleksseeva	1.985	U.R.S.S. Moldavia	Kishinev		Insttnes. preesc. Objet. diversos	17,1
Gorash y Aleksseeva	1.985	U.R.S.S. Moldavia	Kishinev		Insttnes. preesc. Arena	8,2
Gorash y Aleksseeva	1.985	U.R.S.S. Moldavia	Kishinev		Granjas	18,2-57,1

Nº.= número; ESTUD.= estudiados; priv.= privados; Pques.= parques; públ.= públicos; jard.= jardines; infant.= infantiles; Prox.= proximidades; vvdas.= viviendas; plzas.= plazas; zon.= zonas; Insttnes.= instituciones; preesc.= preescolares; Objet.= objetos.

E U R O P A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALIDAD	Nº CASOS ESTUD.	PROCEDENCIA ESTACION DEL AÑO	% DE CONTAMI- NACION
Gorash y Alekseeva	1.985	U.R.S.S. Moldavia	Kishinev		Distritos antiguos	21,1
Gorash y Alekseeva	1.985	U.R.S.S. Moldavia	Kishinev		Distritos modernos	10,8
Zharova	1.976	U.R.S.S. Rusia	Moscú	40	Pques. infant. Primavera	5,2

=====

O C E A N I A

AUTOR	AÑO	PAIS	LOCALIDAD	Nº CASOS ESTUD.	PROCEDENCIA ESTACION DEL AÑO	% DE CONTAMI- NACION
Winkel y col.	1.990	Austral.	Brisbane	41	Cajones arena para juegos	0

=====

Nº.= número; ESTUD.= estudiados; Pques.= parques; infant.= infantiles.

2.6.- EMBRIONAMIENTO DE HUEVOS

Las experiencias llevadas a cabo por distintos autores para conseguir el embrionamiento de huevos de T.canis difieren en los medios de incubación empleados y en los tiempos necesarios para llegar al estadio infestante.

El medio de embrionamiento más utilizado es el **agua formolada**, para evitar el crecimiento de agentes contaminantes durante el periodo de incubación. OSHIMA (1.960) obtiene los huevos de úteros de hembras grávidas tratándolos con hidróxido sódico al 1% para eliminar restos de tejidos y mucus, e incuba en formalina al 0,5%, a temperatura ambiente, durante un período de 24 a 105 días. OLSON (1.960), OLSON y col. (1.970), OLSON y JONES (1.974) y OLSON y SCHULZ (1.980) disminuyen la concentración de formalina al 0,05% y consiguen el embrionamiento entre los 44 y los 100 días a temperatura ambiente (22-24°C). IZZAT y OLSON (1.970) obtienen huevos digiriendo el útero de hembras grávidas con pepsina-clorhídrica, lavan con agua destilada e incuban en formalina al 0,05% a temperatura ambiente (25-27°C), consiguiendo el embrionamiento en un periodo de 40 a 100 días.

BAUFINE-DUCROCÓ y col. (1.974) consiguen reducir el tiempo de embrionamiento a tres semanas, utilizando también como medio formalina al 0,5% a 20-25°C de temperatura.

ZAPART y PRZYJALKOWSKI (1.976), después de lavar los huevos con solución fisiológica, los incuban en placas de Petri a 26°C. Reducen el tiempo necesario para el embrionamiento a dos semanas, usando como medio solución salina con formalina al 2%.

WONG y col. (1.976) cultivan huevos de T.canis en placas de Petri con formalina al 0,05% y obtienen el embrionamiento de los mismos a temperatura ambiente (24°C) en un tiempo de 40 días. Con el mismo medio, pero al 0,5%, LEE y col. (1.976) consiguen el embrionamiento en 5-7 semanas a temperatura ambiente cuando se trata de huevos procedentes de heces de cachorros de tres a cuatro meses de edad. Los mismos resultados son obtenidos por MIN y col. (1.974) y MIN (1.976). LUGUETTI y col. (1.978), utilizando la misma técnica, disminuyen el tiempo a tres semanas, a 25°C.

CYPESS y col. (1.977), GLICKMAN y col. (1.979; 1.981, b) obtienen huevos de hembras grávidas y los embrionan en formalina al 1% durante tres a seis semanas a 22-26°C. Exactamente bajo las mismas condiciones y en el mismo tiempo, DUBEY (1.979) consigue el embrionamiento de huevos de T. canis, obtenidos, asimismo, por disección de hembras grávidas. Utilizando el mismo medio, pero subiendo la temperatura a 30°C., MARVAL y DE MARVAL (1.979) consiguen embrionar en un mes huevos obtenidos de cachorros infestados naturalmente, después de eliminar artefactos a través de filtración por gasa y de varios lavados con agua corriente.

NICHOLAS y STEWART (1.979) extraen los huevos de T. canis a partir de helmintos adultos recuperados de perros callejeros que habían sido sacrificados. Los huevos se desarrollan, hasta contener las larvas infestantes, a una temperatura de 25°C en agua aireada conteniendo un 0,5% de formaldehído. Una vez embrionados, los almacenan en solución salina a 4°C y, antes de utilizarlos, comprueban su viabilidad por intubación gástrica a ratones, considerando como satisfactoria una tasa de recuperación en el hígado del 50% al 60% de la dosis de inóculo a los dos días postinfestación (p.i.).

SMITH y col. (1.980, 1.981, 1.982 y 1.983, c) obtienen hembras de T. canis mediante autopsias de perros, extraen los huevos de los úteros, examinan la viabilidad e incuban a temperatura ambiente (20°C) en formalina al 4%. El estadio infestante se alcanza a las 4-5 semanas, lavando luego en P.B.S. (tampón fosfato salino) para eliminar la formalina.

DESOWITZ y col. (1.981) lavan hembras adultas de T. canis en ClNa 0,15 M, extraen los huevos e incuban en formalina al 1% a temperatura ambiente durante 21 días. CARLIER y col. (1.982) embrionan los huevos de T. canis bajo las mismas condiciones.

KOIZUMI y col. (1.983) disminuyen la concentración de formalina al 0,5% con lo que aumenta el tiempo de embrionamiento a 30-40 días a una temperatura de 30°C.

GENCHI y col. (1.983, a) incuban huevos obtenidos por histerectomía a 27°C durante 27 días en placas de Petri con formalina al 1%.

DUNSMORE y col. (1.983) obtienen adultos de Toxocara del intestino delgado de cachorros infestados naturalmente. Extraen los huevos del útero de hembras adultas y los cultivan primero en hipoclorito sódico al 3% a 26°C durante 3-4 días. A continuación cultivan en formalina al 1% y consiguen el embrionamiento total después de 30-40 días. Este tratamiento previo con hipoclorito sódico, pero al 1%, es utilizado también por CASAROSA y col. (1.983, 1.984), quienes, posteriormente, incuban durante tres semanas en placas de Petri con agua destilada formolada a 23°C.

MAIZELS y MEGHJI (1.984), MAIZELS y col. (1.984), KENNEDY y col. (1.987) y MAIZELS y col. (1.987) recogen hembras de T. canis de perros infestados naturalmente y tratados con antihelmínticos. Incuban en formalina al 4% a temperatura ambiente, requiriéndose de 28 a 56 días para el embrionamiento.

HAY y AITKEN (1.984) incuban en formalina al 5% y a temperatura ambiente, introduciendo la modificación de mantener los huevos en la oscuridad, pero no especifican el tiempo en el que consiguen el embrionamiento, tratándose en este caso de huevos obtenidos del útero de hembras grávidas recogidas de perros infestados de forma natural.

CONCEPCION y BARRIGA (1.985), CARRILLO y BARRIGA (1.987), y BARRIGA y MYSER (1.987) obtienen huevos de T. canis por disección de hembras adultas y digestión del útero con pepsina-clorhídrica en solución salina, con agitación constante y a 37°C. A continuación filtran y lavan los huevos varias veces con solución salina, incubándolos en formalina al 2% en agua destilada a 23°C y en la oscuridad, con un burbujeo constante de aire sobre la suspensión, necesitando cuatro semanas para alcanzar el embrionamiento.

BOWMAN y col. (1.987) también consiguen el embrionamiento a las cuatro semanas, cultivando los huevos en matraz Erlenmeyer con formalina al 0,5%, a temperatura ambiente, agitando suavemente una vez por semana y lavando posteriormente con agua para eliminar la formalina. El mismo procedimiento es utilizado por PARSONS y col. (1.989) y PARSONS y GRIEVE (1.990), quienes, tras el desarrollo larvario, comprueban la viabilidad microscópicamente antes de utilizar los huevos para inoculación experimental.

VEGNI TALLURI y col. (1.986) obtienen los huevos por disección de hembras adultas e incuban en formalina al 1% a 28°C durante cuatro semanas.

BRUNELLO y col. (1.986) obtienen huevos por disección del útero de hembras grávidas de T. canis y los incuban en solución acuosa de formalina (1%) a 27°C durante 30 días.

WADE y GEORGI (1.987), una vez obtenidos los huevos del útero de hembras de T. canis, decortican con hipoclorito sódico al 1%, lavan con solución salina e incuban en formalina al 2% a temperatura ambiente durante al menos un mes.

ROMBERT (1.987) obtiene hembras de T. canis de cachorros y tras su histerectomía, incuba los huevos en solución de formalina al 2% a temperatura ambiente durante 2-3 semanas. GENCHI y col. (1.987) incuban también los huevos de T. canis, obtenidos por el mismo sistema, en una solución de formalina al 1% durante un periodo de 30 días y a una temperatura de 27°C.

La misma temperatura es utilizada por PAHARI y SASMAL (1.990) para embrionar los huevos de T. canis, obtenidos por disección de hembras grávidas, en formalina al 0,5% durante 4-6 semanas. Lavan los huevos con agua antes de su uso a fin de eliminar la formalina.

Otro de los medios de embrionamiento más utilizado es la solución de ácido sulfúrico a distintas concentraciones.

HASS y TODD (1.962) utilizan ácido sulfúrico 0,1 N en agitación constante a 26°C. Este medio es utilizado también por MACCHIONI y MARCONCINI (1.967), quienes, aumentando la temperatura a 30°C, consiguen el embrionamiento en 20 días.

VIENS y col. (1.975), introduciendo agitación constante a temperatura ambiente, observan que el 60-75% de los huevos alcanzan el estadio infestante en un mes. RUITENBERG y BUYS (1.976) consiguen disminuir el tiempo de embrionamiento a 10-14 días, incubando a 30°C en baño de agua.

KAYES y OAKS (1.976, 1.980) y KAYES y col. (1.985, 1.988) recogen hembras grávidas de T. canis, realizan la disección en placas con NaOH 0,1 N y

posteriormente incuban los huevos en ácido sulfúrico 0,1 N a temperatura ambiente durante 28-30 días en la oscuridad. El mismo método es utilizado por BADLEY y col. (1.987).

SUGANE y OSHIMA (1.983, 1.984, 1.985) consiguen el embrionamiento en 40 días en ácido sulfúrico 0,1 N, decortizando previamente los huevos con hipoclorito sódico al 2%. ABDEL-HAMEED (1.984, a) obtiene huevos infestantes de T. canis mediante digestión del útero de hembras grávidas en una solución al 20% de Clorox (hipoclorito sódico al 5,25%), incubando después en ácido sulfúrico 0,1N a temperatura ambiente, pero reduciendo el tiempo a 30 días.

GUPTA (1.984) incuba en el mismo medio y a la misma concentración a temperatura ambiente de 24-27°C con un tiempo similar de 3-4 semanas.

ABO-SHEHADA y HERBERT (1.984, 1.989) y ABO-SHEHADA y col. (1.985) recogen huevos de cachorros tratados con adipato de piperacina. Lavan con hidróxido sódico 0,5 M, enjuagan con agua destilada y resuspenden en ácido sulfúrico 0,1 M incubándolos a 28°C. Los huevos embrionan totalmente a los 15 días.

El mismo medio y la misma temperatura para la incubación, es utilizada por AL-TAE y col. (1.987), tras recoger huevos de heces de cachorros infestados artificialmente por el método de flotación. El estadio infestante se alcanza a los 23 días.

ARES y col. (1.988) obtienen huevos de T. canis a partir de heces de cachorros infestados naturalmente, procesados mediante la técnica de Bailenger. Una vez concentrados se mantienen en solución acuosa de ácido sulfúrico 0,1 N en condiciones de temperatura y luminosidad ambientales hasta su total embrionamiento (28-56 días).

WILLIAMSON y col. (1.990) obtienen adultos de T. canis a partir de heces de perros tratados con antihelmínticos y extraen los huevos viables de la porción terminal del útero de hembras grávidas, embrionándolos en ácido sulfúrico 0,05 M a una profundidad de 1 cm hasta alcanzar su embrionamiento a las 4-5 semanas.

A pesar de ser las soluciones de formalina y de ácido sulfúrico las más utilizadas para el embrionamiento de huevos de T.canis, algunos autores utilizan otros medios de incubación. Así TONGSON y DAYRIT (1.975) embrionan huevos procedentes de úteros en solución fisiológica a temperatura ambiente durante dos semanas.

JENKINS y RICKARD (1.984), tras extraer los huevos del útero maduro de hembras de T.canis, lavan con agua destilada e incuban simplemente en agua, en placa de Petri tapada, a 26°C durante 30 días. También NICHOLAS y col. (1.984, 1.986) incuban en agua a temperatura ambiente en placas de poca profundidad y, una vez embrionados, los almacenan en agua a 4°C.

GUILLEN y col. (1.986, b) incuban huevos procedentes de úteros en solución salina a 37°C y obtienen un 90% de huevos embrionados a los 11 días de incubación, requiriendo unos 32 días cuando pretenden alcanzar el 100% de las formas infestantes.

PROCIV (1.989, a) extrae los huevos de T. canis diseccionando helmintos adultos obtenidos del intestino de perros tras su autopsia y los embriona según el método descrito por PROCIV y BRINDLEY (1.986) para huevos de Toxocara pteropodis: una vez lavados, los deja sedimentar y mezcla el sedimento con carbón activo en placa de Petri, que mantiene cubierta a temperatura ambiente (25-30°C), consiguiendo el embrionamiento a las dos semanas. Antes de utilizarlos, los lava con solución salina 0,15 M, los pasa por un tamiz de 175 μ m y los concentra por gravedad. A continuación los mantiene en una solución de hipoclorito sódico al 10% durante dos horas para destruir los microorganismos contaminantes, quedando así ya preparados para su uso.

INOUE y TSUJI (1.988) recolectan adultos de T. canis del tracto intestinal de perros tras su autopsia y los colocan en placa de Petri conteniendo Medio Mínimo Esencial de Eagle. Recogen los huevos eliminados por las hembras adultas y los incuban en solución salina a 30°C hasta que desarrollan la larva de segundo estadio en su interior.

HUWER y col. (1.989) aíslan huevos de T. canis del útero de hembras adultas, los introducen en una solución de hipoclorito sódico al 3%, incubándolos a 25°C durante 28 días.

2.7.- MÉTODOS DE RECUPERACION LARVARIA

2.7.1.- RECUPERACION LARVARIA A PARTIR DE TEJIDOS

Básicamente podemos englobar los métodos de recuperación larvaria a partir de tejidos infestados en dos bloques: métodos clásicos y otros métodos. Tradicionalmente la cuantificación de larvas de ascáridos se ha venido haciendo por métodos clásicos basados en la digestión artificial o en la trituration de órganos, tales como el método de Baermann, la digestión péptica, el método del "spin" o la digestión salina. Estos métodos son tediosos y presentan múltiples desventajas: las larvas se detectan más fácilmente en unos órganos que en otros, la recuperación de todos los órganos es demasiado laboriosa, requieren mucho tiempo, etc. Actualmente se tiende a utilizar otras técnicas tales como el marcaje radiactivo y la autorradiografía.

En algunas ocasiones se utilizan conjuntamente varias técnicas, siendo la digestión péptica y el Baermann una de las combinaciones más frecuentes. La razón se debe a que con el Baermann únicamente se recuperan larvas libres, mientras que las retenidas en los granulomas requieren una digestión péptica para su liberación.

En cuanto al tratamiento por órganos, en el caso del cerebro, donde las larvas de T. canis permanecen libres y móviles, el recuento se hace directamente por aplastamiento entre porta y cubreobjetos o utilizando el compresor de Berlinese, usado comúnmente para el examen triquinoscópico del músculo.

2.7.1.1.- MÉTODOS CLASICOS

2.7.1.1.1.- Método de Baermann

Su utilidad consiste en la recolección de larvas los distintos tejidos infestados, si bien tiene otras múltiples aplicaciones.

Se ha visto sometido a diversas modificaciones, pero en todas ellas la idea básica consiste en hacer migrar las larvas a través de diferentes tipos de tejidos para separar las viables de las que no lo son. Incluso si se realiza en condiciones estériles, se consigue liberarlas de los microorganismos superficiales por efecto de retención de los mismos en las capas del tejido interpuesto.

La técnica es sencilla y requiere un equipo muy simple. A un embudo de vidrio de unos 12 cm de diámetro se adapta un tubo de goma cerrado por una pinza; se coloca el tejido u órgano, finamente triturado, en un colador metálico tapizado con una ó dos capas de gasa. Se deposita el colador en el embudo, que se rellena de agua a 37°C hasta que el nivel del líquido llegue a contactar con el tejido; se deja reposar 24 horas y al cabo de este tiempo se abre la pinza y se recoge en un tubo de centrifuga el sedimento acumulado en el tubo de caucho; tras centrifugar y eliminar el sobrenadante, se investigan las larvas en el sedimento.

MACCHIONI y MARCONCINI (1.967) aplican el método de Baermann asociado a la digestión péptica para el aislamiento de las larvas de T.canis de hígado y pulmones. Trituran los órganos finamente y los colocan en un disco de papel de filtro realizando un Baermann a 37°C durante 24 horas. Posteriormente recogen el tejido del papel de filtro y realizan una digestión péptica durante 4-6 horas a 37°C para extraer las larvas incapaces de liberarse del tejido por su escasa vitalidad o por encontrarse parcial o totalmente secuestradas.

LEE y col. (1.976) sacrifican los ratones con anestesia general y dividen en dos partes iguales todos los tejidos y órganos, excepto el hígado. Digieren la mitad de cada órgano con jugo gástrico artificial y recogen las larvas en un aparato de Baermann. Tras tinción con hematoxilina-eosina y ácido periódico de Schiff, utilizan la otra mitad para el examen microscópico del tejido.

ZAPART y PRZYJALKOWSKI (1.976), con el fin de realizar un examen parasitológico de ratones infestados con huevos de T.canis, utilizan los métodos de Baermann y digestión, buscando las larvas en el homogeneizado resultante de la digestión de pulmones e hígado.

NICHOLAS y STEWART (1.979) evalúan la eficacia de dos derivados bencimidazólicos (fenbendazol y oxfendazol) sobre las larvas de T. canis en ratón mediante recuperación larvaria, utilizando digestión y Baermann. Trituran cuidadosamente hígado, pulmones, riñones y músculo, digiriéndolos después durante cinco horas en solución salina con tripsina al 1%, a 37°C y en agitación continua. Colocan el resultado de la digestión en un aparato de Baermann cubierto con solución salina durante toda la noche, utilizando una fina capa de papel higiénico sobre cuatro capas de tela empleada en la fabricación de queso. Posteriormente recogen 10 ml de solución salina y efectúan el recuento de las larvas; para estimar la cantidad de las mismas en musculatura, cogen la mitad derecha e izquierda de la canal alternativamente en cada uno de los ratones a examinar. En el caso de los cerebros la digestión con tripsina es innecesaria y, tras triturar el órgano, incuban a 37°C durante cinco horas en solución salina antes de realizar la técnica de Baermann.

CASAROSA y col. (1.983) evalúan la eficacia de la ivermectina en el tratamiento de ratones infestados con huevos embrionados de T. canis mediante examen microscópico directo de cerebro o mediante inmersión de las vísceras en aparato de Baermann durante 24 horas a 37°C.

NICHOLAS y col. (1.984) recuperan larvas de T. canis por el método de Baermann, para evaluar la actividad protectora de preparados antigénicos frente a este ascárido.

PARSONS y GRIEVE (1.990, b) recuperan larvas de T. canis del contenido intestinal de ratones infestados experimentalmente utilizando la técnica de Baermann y efectuando posteriormente el recuento de las larvas al microscopio.

2.7.1.1.2.- Digestión péptica

El método de la digestión péptica consiste en liberar las larvas de los tejidos mediante el tratamiento de los mismos en fluido gástrico artificial.

HERLICH (1.956) utiliza un método de digestión para recuperar nematodos de rumiantes que ya fue empleado por SCHWART en 1.939 para la liberación de larvas de Trichinella de la musculatura.

SPRENT (1.952) recupera larvas de ascáridos de ratones blancos mediante una modificación de esta técnica, preparando la solución de digestión por el método de SCHWART (1.939): 600 ml de agua, 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y 5-6 g. de pepsina por cada media libra de canal a digerir. Tras incubar toda la noche a 37°C observa que la mucosa intestinal se digiere completamente y sólo permanecen sin digerir trozos de serosa en la mayoría de los casos. Después de recolectar una alícuota del material digerido, realiza su exámen directamente al microscopio.

En 1.960, OLSON, recupera larvas de Toxocara y Ascaris por esta misma técnica de digestión péptica. Básicamente su método consiste en digerir los tejidos con pepsina al 0,75% a pH 1,5, manteniéndola durante una hora en agitación continua y en baño de agua a 37°C.

OSHIMA (1.960) emplea el método de SPRENT (1.952), modificado para recuperar las larvas de los tejidos. Divide en dos partes canal y cerebro y utiliza una de ellas para el recuento larvario. El recuento de larvas en cerebro lo realiza directamente por aplastamiento de tejido entre dos portas. Suspende la canal y otros órganos en fluido digestivo (1% de pepsina a pH 1,5) y los coloca en batidora, utilizando 90 ml para la mitad de la canal y 60 ml para el resto de los órganos. Tras incubar a 37°C durante 3-4 horas, centrifuga y cuenta las larvas en el sedimento.

OKOSHI y USUI (1.968) recuperan las larvas de animales inoculados con huevos de ascáridos utilizando la técnica de digestión péptica descrita por SPRENT (1.952), aplicando la técnica de Baermann sólo en aquellos casos en los que las larvas obtenidas son utilizadas para una segunda inoculación.

OLSON y col. (1.970) eliminan rabo, patas, piel y tracto intestinal del animal para dejar libre la canal, la cual es digerida en un fluido compuesto de 7,5 g. de pepsina en polvo, 8,5 g. de cloruro sódico y 10 ml de ácido clorhídrico concentrado en un litro de agua destilada. Colocan cada canal en una batidora conteniendo 200 ml de pepsina, triturándolas a gran velocidad durante 45 segundos. Posteriormente digieren la mezcla durante

una hora a 37°C en un baño de agua con agitación constante (50 r.p.m.). Tras dejar sedimentar el material digerido durante tres horas, suspenden el sobrenadante en 10 ml de caldo de gelatina, tomando tres muestras de 0,25 ml, que son examinadas al microscopio para efectuar el recuento de las larvas presentes en las mismas.

TONGSON y DAYRIT (1.975) digieren directamente en fluido digestivo sin tratamiento previo en batidora. Colocan estómago, intestino, ciego, mesenterio, diafragma, bazo, corazón, riñones, hígado, cerebro, ojos, musculatura y pulmones en placas de Petri, por separado. Cortan los órganos en pequeños trozos, los envuelven por separado en una gasa estéril y los suspenden en fluido de digestión 24 horas a 37°C. Tras la incubación, examinan el fondo del fluido de digestión y cuentan el número de larvas. El fluido digestivo utilizado por dichos autores está compuesto de 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y 6 g. de pepsina en 100 ml de agua destilada.

KAYES y OAKS (1.976) digieren individualmente hígado, corazón, pulmones y sistema genitourinario, así como la mitad anterior y posterior de la canal, utilizando 100 ml de pepsina clorhídrica (pH 1,5 - 1,8) a 37°C toda la noche. Tras centrifugar a máxima velocidad la suspensión resultante, examinan el sedimento en un porta, contando las larvas al microscopio.

PRZYJALKOWSKI y col. (1.978) detectan la presencia de larvas en las porciones anterior, media y posterior de cerebro mediante el método de compresión, mientras que para el resto de los órganos realizan una digestión péptica.

SUGANE (1.982) suspende cada órgano en una solución de pepsina al 0,1%, lo tritura en un homogeneizador de tejidos e incuba a 37°C durante cuatro horas. Coloca los órganos así digeridos en una placa de vidrio y realiza el recuento de larvas al microscopio. Para el examen del cerebro, aplasta directamente este órgano entre dos portaobjetos, contando las larvas al microscopio.

SUGANE y OSHIMA (1.982) digieren de forma separada músculo esquelético, hígado, pulmones, corazón, bazo y riñones en pepsina al 1% a pH 1,5, según el método descrito por OSHIMA (1.961).

ABDEL-HAMEED (1.984 a, b) utiliza el siguiente procedimiento para la recuperación larvaria: tras cortar convenientemente hígado, pulmones y mitad de la canal y triturarlos en batidora durante 30 segundos, digiere durante tres ó cuatro horas en una solución consistente en un 0,5% de pepsina P/V y ácido clorhídrico al 0,7% V/V en agua corriente, utilizando 200 ml de fluido para la mitad de la canal y 100 ml para hígado y pulmones. Tras la correspondiente incubación filtra por gasa y sedimenta mediante centrifugación.

ABO-SHEHADA y col. (1.985) y ABO-SHEHADA y HERBERT (1.985) recuperan las larvas de los distintos órganos mediante la técnica de digestión ácida descrita por SPRENT (1.952).

CONCEPCION y BARRIGA (1.985) determinan la intensidad y distribución de la infestación experimental murina por T. canis mediante recuperación larvaria a partir de nódulos linfáticos mesentéricos, hígado, pulmones, cerebro y canal. Trituran y digieren cada tejido por separado en pepsina al 0,5% con ácido clorhídrico al 0,75% durante tres horas a 37°C. Tras filtrar el resultante de la digestión a través de doble gasa, centrifugan a 500 xg durante cinco minutos y estiman el número total de larvas examinando el sedimento completo o mediante titulación de alícuotas.

SIVACHELVAN y MUNASINGHE (1.986) estudian la invasión larvaria del músculo esquelético de ratones por Toxocara vitulorum mediante digestión péptica. Extraen el músculo de cuello, tronco y extremidades, desmenuzándolo y digiriéndolo en pepsina clorhídrica a 40°C durante ocho horas. Posteriormente mezclan el sedimento resultante de centrifugar el extracto con solución salina y lo examinan al microscopio en busca de las larvas.

MASTI y col. (1.986) evalúan la migración de T. canis en ratones, determinando el contenido de larvas en hígado, pulmones y cerebro después de la digestión con pepsina clorhídrica.

VAN GORP y col. (1.987) digieren intestinos, hígado, pulmones, canal, cerebro y riñones de ratones infestados por T. vitulorum mediante digestión individual en pepsina a 10 mg/ml en agua acidificada con ácido clorhídrico a 11,4 mol/l hasta pH 1,7.

BARRIGA y MYSER (1.987), para determinar el número de larvas en los ratones infestados con T.canis, pesan hígado, pulmones, cerebro y canal de cada uno de ellos. Tras cortar pulmones, cerebro, 1/3 del hígado y 1/7 de la canal (incluyendo espina dorsal y área abdominal) los digieren por separado, utilizando un fluido de digestión preparado al 0,7% de pepsina y al 0,7% de ácido clorhídrico en solución salina 0,15 M. Digieren a 37°C durante seis horas en agitación constante y filtran el resultante de cada digestión a través de una doble capa de tela húmeda utilizada para la fabricación de quesos; centrifugan y recogen 1 ml del sedimento, al que añaden 0,5 ml de formalina al 30% y unos cristales de verde malaquita, con lo que se tiñen los deshechos, quedando las larvas sin teñir.

PROCIV (1.989, a) compara la eficacia de distintas soluciones de digestión en la recuperación larvaria de T. pteropodis a partir de hígados de ratones infestados experimentalmente. Tras sacrificar los animales por dislocación cervical, extrae el hígado, picándolo finamente con tijeras; divide el tejido en seis porciones del mismo peso y los coloca en bolsas formadas por doble gasa de algodón en contenedores de 80 ml con solución salina al 0,85%, tripsina al 2% y pepsina al 1%, incubando a 37°C durante distintos intervalos de tiempo; a continuación transfiere cada muestra de hígado en su bolsa de gasa a un contenedor con la correspondiente solución de digestión recién preparada; fija los sedimentos en formalina al 3% a 70°C y los examina al microscopio en placas de recuento.

Observa que la mayor cantidad de larvas se recuperan con solución salina y la menor cantidad con pepsina, si bien estadísticamente las diferencias no son significativas. También infesta dos ratones con Toxocara cati y recupera casi el 20% de la dosis de inóculo, no detectando tampoco diferencias significativas entre la eficacia de la solución salina y la pepsina.

En este mismo trabajo, estudia la influencia de la congelación del hígado en la recuperación larvaria posterior. Observa que las larvas encontradas en el sedimento de hígados no congelados son perfectamente móviles, mientras que las procedentes de hígados congelados están muertas. Para realizar esta observación, examina pequeñas porciones de hígado entre dos portaobjetos antes de la incubación.

PARSONS y GRIEVE (1.990, a) estudian el efecto de la dosis de huevos embrionados y del genotipo del hospedador sobre la retención larvaria hepática en la toxocarosis murina. Anestesiados los ratones, los sacrifican por dislocación cervical y recogen el hígado sobre una placa de Petri que contiene 10 ml de P.B.S. 0,01 M (pH 7,2), desmenuzándolo cuidadosamente. Lo transfieren a un recipiente que contiene 40 ml de una solución de pepsina clorhídrica (pH 1,5) formada por un 0,5% P/V de pepsina porcina y un 0,26% de ácido clorhídrico, con tres gotas de octanol, batiendo durante 10 segundos y evitando la homogeneización prolongada. Posteriormente transfieren el homogeneizado a un Erlenmeyer de 250 ml completando con la solución de pepsina hasta un volumen final de 100 ml, incubando en un agitador con baño de agua a 37°C. Tras 6-8 horas de incubación, centrifugan a 1.000 xg durante cinco minutos y resuspenden el sedimento en solución de pepsina-clorhídrica recién preparada hasta un volumen de 50 ml. Después de redigerir la suspensión tras 20-24 horas de incubación, centrifugan del mismo modo y resuspenden el sedimento en un volumen final de 4-5 ml, colocándolo en un portaobjetos y contando el número total de larvas al microscopio.

PARSONS y GRIEVE (1.990, b) utilizan el método anteriormente indicado para recuperar larvas de T. canis de hígado, pulmones, cerebro, mesenterio (incluido páncreas y nódulos linfáticos mesentéricos) y músculo esquelético.

2.7.1.1.3.- Método del "spin"

El método del "spin" es una técnica donde los tejidos son homogeneizados, filtrados y centrifugados para recuperar las larvas de los mismos. JOHNSTONE y col. (1.978) deducen, por comparación de porcentajes de recuperación, que se trata de un sistema más eficaz que el Baermann y la digestión péptica para la recuperación de larvas de Ascaris suum del hígado y pulmones de ratones C57BL/6 infestados experimentalmente. Sacrifican los animales por dislocación cervical y sumergen hígado y pulmones en solución salina; tras homogeneizar cada órgano por separado en una batidora a 17.000 r.p.m. durante 20 segundos en 40 ml de solución salina con citrato y dos gotas de octanol como antiespumante, filtran por triple gasa estéril y lavan tres veces en solución salina con citrato. El primer lavado implica centrifugar a 1000 xg durante 60 segundos y para el segundo y el tercer

lavado centrifugan a 500 xg durante 20 segundos. Finalmente cuentan las larvas en el sedimento total.

DUNSMORE y col. (1.983) emplean una modificación del método del "spin" descrito anteriormente para recuperar larvas, en este caso, de T.canis. Sacrifican los ratones con cloroformo, y separan cerebro, hígado, pulmones y músculo de la pata trasera, cubriéndolos con solución salina. Con excepción del cerebro, homogeneizan por separado órganos y tejidos en 15 ml de citrato sódico al 0,25 % en P.B.S., seguidos de centrifugación. Posteriormente efectúan el recuento larvario en un microscopio invertido.

2.7.1.1.4.- Digestión salina

PROCIV y BRINDLEY (1.986) utilizan un método que denominan "digestión salina" para recuperar larvas de T. pteropodis de los tejidos de ratones infestados experimentalmente. De cada canal eliminan piel, hocico y rabo, sacan el tracto intestinal del abdomen, lo abren longitudinalmente y lo enjuagan vigorosamente en solución salina. Pican con tijeras y por separado, cerebro, pulmones, hígado, riñones, nódulos linfáticos mesentéricos, mesenterio y pared intestinal; suspenden a continuación, cada órgano triturado en 24 capas de gasa, soportadas por una malla de nylon para insectos y lo sumergen en un recipiente con solución salina, incubando durante 18 horas a 37°C (digestión salina). Para el resto de la canal trituran en batidora a alta velocidad durante 30 segundos y digieren de la misma forma. Al finalizar la incubación, fijan el sedimento con un volumen igual de formalina al 6%, buscando las larvas en una placa de vidrio rayada al microscopio invertido.

La misma técnica es utilizada por PROCIV (1.989, a) para estudiar la migración larvaria de T. pteropodis y T. canis en murciélagos australianos (Pteropus poliocephalus) infestados oral y parenteralmente.

2.7.1.2.- OTROS METODOS

El **marcaje radiactivo** se ha venido utilizando en los últimos años para desarrollar técnicas alternativas en la investigación del comportamiento

migratorio de larvas parásitas. Sin embargo, estos radioensayos proporcionan un valor limitado en el rastreo de las larvas marcadas, ya que el contador de radiación no distingue entre el isótopo ligado a los parásitos y los acúmulos de radiación fijados a tejidos del hospedador (CHRISTENSEN y NANSSEN, 1.979).

DOBINSON y col. (1.980) marcan schistosómulas de Schistosoma mansoni con L-⁷⁵Se-metionina con el fin de estudiar su comportamiento migratorio en ratones. Inyectan los animales con 1.000 schistosómulas, los sacrifican los días 0, 2, 4, 8, 14, 18 y 24 p.i. y monitorizan la radiactividad en pata trasera izquierda, pulmones, corazón, hígado e intestino. Observan que, durante este periodo de tiempo, las cuentas caen exponencialmente en la pata desde 4.000 hasta 60 cuentas por minuto (c.p.m.), por encima del ruido de fondo (aproximadamente 60 c.p.m.). En pulmones observan que las cuentas se elevan desde el segundo día hasta el día 18, con un pico de 400 c.p.m. entre los días cuatro y ocho p.i.. Esta elevación en la radiactividad detectada en pulmones se correlaciona con la recuperación de esquistosómulas por otras técnicas, como la perfusión. Asimismo observan que en corazón, las cuentas permanecen a un bajo nivel (10-30 c.p.m.) desde el segundo día en adelante, mientras que en hígado e intestino se elevan a 400 c.p.m. el segundo día p.i. y permanecen así de elevadas a lo largo de todo el estudio. Estos autores concluyen que el procedimiento de marcar las esquistosómulas y cuantificarlas con un contador de centelleo es válido sólo en los estudios en los que no tiene lugar el metabolismo de la metionina, (como, por ejemplo, en pulmones) pero en aquellos casos donde está implicada una migración hepática o intestinal la técnica no es adecuada por el elevado nivel de incorporación del isótopo radiactivo en los tejidos.

Otro método de recuento larvario es la autorradiografía, capaz de detectar cada una de las larvas marcadas en el cuerpo de un ratón o de cualquier otro pequeño hospedador. En este procedimiento, la película de rayos X se expone por contacto a secciones de los órganos planos y secos y la localización de las larvas radiactivas viene representada por focos de plata reducida en la película expuesta y revelada. La radiactividad disociada produce una oscuridad uniforme por toda la película pero no produce focos.

WADE y GEORGI (1.987) utilizan el método autorradiográfico para estudiar la distribución de las larvas de T.canis en ratones CD-1 y realizar el

recuento de las mismas en diferentes órganos. Eclosionan artificialmente larvas infestantes y las marcan por cultivo en Medio 199 conteniendo ^{75}Se -metionina; infestan los ratones con larvas radiomarcadas mediante intubación intragástrica o inyección intraperitoneal (I.P.). Tras el sacrificio, someten los órganos a autorradiografía tras su compresión en prensa hidráulica bajo una fuerza de 445 KNewtons. Revelan las películas en un procesador automático y cuentan los verdaderos focos radiográficos a 1,2x aumentos.

ROBERTS (1.990) aplica también el método autorradiográfico para estudiar el ciclo de T. vitulorum en el búfalo asiático (Bubalus bubalis). Eclosionan las larvas, tras decorticar los huevos con hipoclorito sódico, mediante burbujeo de la suspensión con anhídrido carbónico a 38,5°C. Después de marcarlas con ^{75}Se -metionina y administrarlas por vía oral (V.O.) e inyección intraduodenal, las localiza en los tejidos del hospedador mediante detección fluororadiográfica exaltada. Enfrenta las secciones de tejido a estudiar a una película de rayos X colocada entre dos pantallas de wolframato cálcico, exponiéndolas a la misma durante cuatro semanas a -70°C. Finalmente cuenta los focos de radiactividad con la ayuda de un tubo de luz fluorescente.

Por otro lado, el fenómeno de la **resonancia magnética nuclear (RMN)** se viene usando frecuentemente en Biología y Medicina para detectar estados patológicos en los tejidos. Los resultados de los estudios espectrofotométricos de DAMADIAN (1.971), primero sobre muestras biológicas y luego sobre organismos vivos completos, muestran diferencias en T_1 y T_2 , como constantes en el proceso de relajación en la RMN, entre tejidos sanos de rata y tejidos cancerosos.

GRABIEC y col. (1.988, a) estudian los cambios en los tiempos de relajación del protón T_1 y T_2 en músculo, bazo y nódulos linfáticos de ratones infestados con Trichinella spiralis y Trichinella pseudospiralis en un espectrofotómetro SXP 4/100, a una intensidad de 0,6 T de campo magnético y 25 MHz de frecuencia. Observan que la infestación con larvas de Trichinella cambia los tiempos de relajación de T_1 y T_2 en los tejidos de los ratones infestados; la prolongación en el tiempo de T_1 , observado en tejidos alterados por procesos cancerosos, también tiene lugar en las infecciones por parásitos, si bien con un menor alcance; y los tiempos de relajación de T_1

y T_2 en los tejidos del hospedador pueden indicar una respuesta submolecular del organismo a la infección.

GRABIEC y col (1.988, b), utilizando también los tiempos de relajación T_1 y T_2 en el proceso de RMN y considerándolos como indicadores de cambios tisulares, estudian dichos tiempos en el hígado de ganado infestado con Fasciola hepática. Observan que los tiempos de relajación se incrementan en el parénquima hepático y en las paredes de los conductos biliares de los hígados infestados. Observan asimismo que el incremento en el tiempo de T_1 alcanza el 53% en el parénquima y el 82% en el tejido del conducto biliar. Aplican un índice para determinar el grado de malignidad de los tejidos infestados que, según dichos autores, es de 2,8 para el parénquima y de 3,3 para las paredes del conducto biliar. Demuestran así la utilidad de este índice en muchos fenómenos biológicos relativos a la Parasitología.

2.7.2.- RECUPERACION LARVARIA A PARTIR DE CAVIDADES

CONCEPCION y BARRIGA (1.985) reportan evidencias de que las larvas de T. canis pueden migrar por otras rutas diferentes a la circulación. Sangran cinco ratones previamente infestados durante 10 días y lavan vísceras abdominales y cavidad peritoneal con solución salina. Someten el resultante de estos lavados, así como la sangre recogida, previamente heparinizada, al siguiente tratamiento: diluyen con el mismo volúmen de formalina al 10% y, tras centrifugar a 500 xg durante cinco minutos, añaden una gota de solución salina con verde malaquita al sedimento, buscando las larvas al microscopio.

PROCIV (1.989, a), investiga la migración transperitoneal de T. canis en ratones infestados con 500 huevos embrionados, realizando un recuento larvario en el interior del tracto gastrointestinal y en la cavidad peritoneal inmediatamente después de sacrificarlos (a las 16 y 21 horas p.i.) y tras cuatro horas de permanecer muertos. Para ello, una vez sacrificados, inyecta 10 ml de solución salina en la cavidad peritoneal, agita suavemente durante 30 segundos y extrae el contenido a través de una incisión longitudinal central; a continuación enjuaga dicha cavidad con 20 ml más de solución salina, deja reposar los lavados durante una hora, procediendo después a la fijación de los sedimentos. Para evaluar el contenido larvario en el

tracto gastrointestinal, ata el esófago y el recto de cada ratón, retirando el contenido abdominal en bloque, sumergiéndolo a continuación en 60 ml de solución salina durante cuatro horas a temperatura ambiente (28°C). Por último, fija los sedimentos para examinar las larvas. Con objeto de estudiar esta migración transperitoneal, pero en condiciones "post mortem", deja otro grupo de animales intactos en reposo durante cuatro horas después de su sacrificio, procediendo después al lavado de la cavidad peritoneal del modo descrito.

2.8.- MIGRACION LARVARIA EN ANIMALES DE LABORATORIO

Al estudiar la migración larvaria de T. canis en animales de laboratorio a través de los distintos métodos de recuperación, se plantea el problema de la cantidad de factores que influyen en la misma, así como el hecho de que cada autor trabaja bajo condiciones diferentes: tamaño del inóculo, vía de administración, momento del sacrificio, método de recuperación, cepa de ratones, etc.

JOHNSTONE y col. (1.978) comparan tres métodos de recuperación larvaria (Baermann, digestión péptica y método del "spin") bajo idénticas condiciones de experimentación, deduciendo, en base a los porcentajes de recuperación obtenidos, que el más eficaz en este caso, para larvas de A. suum, es el método del "spin".

OLSON (1.960) inocula ratones V.O. con 1.000 huevos de T. canis y los sacrifica a las dos semanas p.i.. Observa que el mayor número de larvas recuperadas por digestión péptica se obtiene del sistema nervioso central (SNC) y del músculo esquelético, mientras que el resto de los órganos reúnen un menor número de larvas viables. En SNC obtiene 55 larvas, que frente a las 209 totales suponen un 26% respecto al total recuperado (5,5% respecto al inóculo); en músculo esquelético recupera 143 larvas, que hacen un 68,42% respecto al total recuperado (14,3% respecto al inóculo); en hígado recupera siete larvas, 3,3% respecto al total recuperado (0,7% respecto al inóculo); en pulmones tres larvas, 1,43% respecto al total (0,3% respecto al inóculo); y en riñones una sola larva, lo que supone tan sólo un 0,47% respecto al total y un 0,1% respecto al inóculo.

MOSHIMA (1.960) inocula ratones hembras de la cepa Swiss con 500 huevos embrionados de T. canis. Utilizando una modificación del método de digestión péptica de SPRENT (1.952), observa que la mayoría de las larvas que penetran en la pared intestinal migran al hígado en el espacio de 48 horas tras la inoculación. Juzgando las vías de migración observadas a lo largo de 22 días de experiencia, considera que el momento más adecuado para recuperar las larvas de los ratones es aquel en el que éstas se concentran en hígado y pulmones. Sus experiencias demuestran que a las 44 horas p.i., aproximadamente el 98% de las larvas se encuentran en hígado y pulmones. La media del porcentaje de larvas recogidas colectivamente en estos órganos es del

97,6% para una serie de seis ratones y del 98,8% para otra serie diferente de cinco ratones.

MACCHIONI y MARCONCINI (1.967), recuperando larvas por Baermann asociado a digestión péptica, analizan tres métodos para el estudio de la infestación por T.canis en ratón blanco: ingestión oral de huevos embrionados, y administración I.P. y subcutánea (S.C.) de larvas de segundo estadio.

Para una infestación V.O. con 1.000 huevos, el máximo número de larvas se recupera en hígado el segundo día p.i. -533 larvas frente a las 548 totales-, lo que supone un 97,26% respecto al total recuperado (53,3% respecto al inóculo). En pulmones observan el máximo el tercer día p.i., con 72 larvas frente a las 443,5 larvas totales, lo que representa un 16,23% respecto al total (7,2% respecto al inóculo). En encéfalo obtienen el máximo el día 30 p.i., con 154,4 larvas frente a las 358,5 totales, lo que significa un 43,06% respecto al total (15,45% respecto al inóculo). El máximo en la canal lo encuentran el día 10 p.i., con 196 larvas frente a 277 totales ese día, lo que supone un 70,75% frente al total (19,6% respecto al inóculo).

Por vía S.C., el máximo lo recuperan en la canal el tercer día p.i., siendo 48,7 larvas las encontradas en este órgano frente a las 59,4 totales (81,98% respecto al total, 12,17% respecto al inóculo de 400 larvas). Por vía I.P. obtienen el máximo en hígado el día dos p.i., con 278 larvas frente a las 367,3 totales encontradas ese día. Esto supone un 75,68% respecto al total y un 39,71% respecto al inóculo de 700 larvas.

OKOSHI Y USUI (1.968) inoculan ratones con 3.000 huevos embrionados de T.canis y recuperan larvas mediante digestión péptica. Primero recuperan de hígado y pulmones y más tarde de canal y cerebro. Del día nueve en adelante observan que las larvas se encuentran principalmente en canal y cerebro y permanecen vivas hasta el día 60 p.i.. El primer día recuperan el máximo en intestino, 305 larvas frente a 596 totales, lo que supone un 51,17% respecto al total (10,16% respecto al inóculo). En hígado también encuentran el máximo número de larvas el primer día, con 280 larvas lo que significa un 46,97% respecto al total para ese día (9,33% respecto al inóculo). En pulmones y vísceras (corazón, riñones, páncreas y bazo), obtienen el máximo el

tercer día p.i., siendo 132 larvas las encontradas en pulmones frente a 541 totales, lo que supone un 24,39% respecto al total (4,4% respecto al inóculo) y 43 larvas las recuperadas en vísceras, que suponen un 7,94% respecto al total (1,43% respecto al inóculo). Encuentran el máximo en la canal a los 60 días p.i., recuperando 394 larvas, que frente a las 484 totales suponen un 81,40% (13,13% respecto al inóculo). En cerebro, observan el máximo a los nueve días p.i., con 202 larvas que hacen un 35,37% respecto a las 571 totales encontradas ese día (6,73% respecto al inóculo).

OLSON y col. (1.970) digieren la canal de ratones machos (Fairfield - Webster) infestados V.O. con distintas dosis de huevos embrionados de T.canis. Para una dosis de 5.280 huevos, recuperan el máximo el día dos p.i., siendo éste del 27% respecto al inóculo. Para una dosis de 4.260 huevos, encuentran el máximo el día 23 p.i. con un 35% de larvas respecto al inóculo, y, para una tercera dosis de 3.300 huevos, observan un máximo del 27% respecto al inóculo el día 24 p.i..

HO y KOBULEY (1.974) inoculan ratones con 2.500 huevos de T.canis, sacrificándolos a los dos y 75 días p.i., observando que las larvas migran, a través de la pared intestinal, a hígado, corazón y pulmones, y a otros órganos a través de la circulación sistémica. En cerebro encuentran más larvas que en ningún otro tejido y observan que éstas permanecen vivas en ratón durante 10-12 meses.

LEE y col. (1.976), aplicando una modificación del método de Baermann en ratones hembras albinos, inoculados con 1.000 huevos embrionados de T.canis, observan que la mayoría de las larvas llegan al hígado en 48 horas. A las 24 horas p.i. encuentran en hígado el 24% de las larvas recuperadas y el 28% de las larvas inoculadas. A las 48 horas obtienen el 90% de las larvas recuperadas y el 44% del total de las administradas. Observan que a partir de las 48 horas el número de larvas en este órgano desciende rápidamente durante los tres días siguientes, y, luego, de forma gradual, hasta no encontrarse ninguna después de las seis semanas. La mayor concentración de larvas en distintos órganos obtenida por estos autores, es la siguiente:

- En hígado, el máximo se observa el primer día p.i., encontrándose 280 larvas, que, frente a las 296 totales recuperadas, equivalen al 94,59% respecto al total, y al 28% respecto al inóculo.

- En pulmones, el máximo se observa el día tres p.i., con 110 larvas, frente a 444 totales, lo que supone un 25% respecto al total y un 11% respecto al inóculo.

- En la canal aparece el máximo el día 28 p.i., recuperándose 210 larvas, que frente a las 320 totales para ese día, equivalen al 65,62% (21% respecto al inóculo).

- En cerebro se recupera el máximo al cabo de ocho semanas, 120 larvas frente a 204 totales, lo que supone un 44,11% respecto al total recuperado (12% respecto al inóculo).

VOLKOVA y SOLYANIK (1.975) inoculan ratones con 200 ó 1.000 huevos de T.canis observando gran número de larvas retenidas en hígado a los 2-3 días p.i.. A los 4-5 días encuentran muchas en pulmones. No observan diferencias significativas (excepto inflamación local) entre la administración de huevos por V.O. o por vía parenteral y detectan un aumento de mucopolisacáridos y glicógeno en los lugares de la inflamación, células hepáticas y pulmones.

KAYES y OAKS (1.976) inoculan ratones machos de la cepa HaM/ICR con tres dosis diferentes de huevos embrionados de T.canis, 200, 600 y 1.000 huevos. Tras sacrificarlos los días 7, 14, 28 y 56 p.i., encuentran que un análisis de las larvas recuperadas de canal, hígado, cerebro y sistema cardiopulmonar sugiere que la cantidad inoculada es un factor significativo determinante de la proporción de larvas recuperadas en cada órgano. De los ratones inoculados con 1.000 huevos V.O., tras recuperación larvaria mediante digestión péptica, obtienen los siguientes máximos:

- En hígado el máximo número de larvas aparece el día 28 p.i., con 28 larvas que frente a las 240 totales recuperadas ese día, suponen un 11,66% (2,8% respecto al inóculo). Ese mismo día se recupera también el mayor porcentaje de larvas de la canal anterior, 130 larvas, que suponen un 54,16% respecto al total (13% respecto al inóculo).

- En corazón y pulmones, sistema genitourinario y canal posterior, la mayor cantidad de larvas aparece el séptimo día p.i.. En corazón y pulmones aparecen 30 larvas, que, frente a las 271 totales, suponen un 11,07% (3% respecto al inóculo). En el sistema genitourinario se encuentran 12 larvas, que equivalen al 4,42% respecto al total recuperado ese día (1,2% respecto al inóculo); y en la canal posterior se recuperan 54 larvas, lo que supone un 19,92% respecto al total y un 5,4% respecto al inóculo.

- En cerebro, la mayor cantidad de larvas aparece el día 56 p.i., encontrando 64 larvas, que suponen el 27,35% respecto al total de 234 larvas encontradas ese día (6,4% del inóculo).

ZAPART y PRZYJALKOWSKI (1.976) utilizan los métodos de Baermann y digestión para la recuperación larvaria en ratones machos C3H, inoculados con distintas dosis de huevos embrionados de T.canis por V.O.. Los resultados de sus investigaciones en busca de larvas en órganos internos son mayoritariamente negativos. Sin embargo, el sexto día p.i. encuentran larvas en pulmones e hígado de los ratones examinados por Baermann. El número de larvas en pulmones no está definido estrictamente, ya que no cuentan con el órgano completo para su exámen.

PRZYJALKOWSKI y col. (1.978) inoculan ratones machos de la cepa C3H con 3.000 huevos embrionados de T.canis V.O. y detectan la presencia de larvas en cerebro por compresión y en el resto de los órganos por métodos de digestión artificial. Obtienen las siguientes medias dentro del rango indicado entre paréntesis:

- Al sexto día p.i., la media del número de larvas en hígado es 69 (65-89) y en cerebro 29 (7-100).

- Al octavo día p.i., la media encontrada en riñones es 57 larvas (45-83) y en cerebro 75 (49-110).

- El decimosegundo día p.i., encuentran una media de 185 larvas (11-268) en cerebro, detectando la mayor cantidad en la porción posterior y la menor cantidad en la porción anterior del cerebro.

BURRIGTH y col. (1.982) inoculan 250, 500 y 1.000 huevos de T.canis en ratones machos Binghamton y los sacrifican a las 48 horas p.i.. Recuperan del hígado, sin especificar método, aproximadamente un 34% en el primer lote, un 63% en el segundo y un 70% en el tercero, respecto a la dosis infestante. Este 60-70% recuperado es consistente con estudios previos de estos autores en los que utilizan 1.000 huevos embrionados para el inóculo -DOLINSKY y col. (1.981), DONOVICK y col. (1.981)-.

MIN (1.982) estudia la recuperación de larvas a partir de cerebros de ratones tras la infestación con 500 huevos embrionados de T.canis. Observa que ésta aumenta del 0,4% al 10,6% desde el segundo día al 28 p.i. y recupera de cerebro aproximadamente la mitad de la dosis inoculada.

PROKOPIC y FIGALLOVA (1.982. a) inoculan 2.100 huevos de T.canis por hospedador (ratón blanco) recuperando el máximo de larvas en hígado a las 48 horas p.i.; en pulmones y en corazón a los cuatro días; y en cerebro después de los 14 días p.i.. En tráquea observan que las larvas aparecen entre los días siete al 28, con un máximo en el día cuatro p.i.. En músculo de la pata encuentran las larvas desde el día cuatro p.i., con una máxima aparición el día 28 p.i.. En diafragma, observan que las larvas aparecen mayoritariamente el día cuatro y, entonces, el número disminuye hasta el día 28. En la lengua, encuentran el máximo número de larvas el día 14. En músculos intercostales, observan la aparición de las larvas entre los días cuatro y 28 (máximo en el día 21). Solamente encuentran dos larvas en bazo a los dos días p.i. y en los ojos encuentran larvas a los cuatro y 21 días p.i.. Observan que las larvas de T.canis aparecen en hígado en un 82%, en pulmones en un 80% y en cerebro en un 68%.

SUGANE y OSHIMA (1.982) estudian la migración larvaria en ratones BALB/c inoculados con 500 huevos embrionados de T.canis, utilizando la digestión péptica como método de recuperación y sacrificando los animales a las 2, 4, 6, 8, 10 y 12 semanas p.i.. Los resultados se expresan a continuación:

- En hígado el máximo número de larvas aparece la décima semana p.i., 13 +/- 9 larvas, que, frente a las 118 +/- 17 totales recuperadas ese día, equivalen a un 11 % (2,6% respecto al inóculo).

- En músculo esquelético encuentran la mayor cantidad de larvas la segunda semana p.i., 122 +/- 21 larvas, equivalentes al 64,21% respecto a las 190 +/- 30 larvas recuperadas ese día (24,4% respecto al inóculo).

- En cerebro el máximo aparece la décima semana p.i., con 72 +/- 9 larvas, que frente a las 118 +/- 17 totales para ese día, suponen un 61,0% (23,6% respecto al inóculo).

CASAROSA y col. (1.983), utilizando como método de recuperación un Baermann asociado a digestión péptica, en ratones inoculados V.O. con 2.000 huevos de T.canis, y sacrificándolos a los siete y 20 días p.i., recuperan el máximo en hígado y pulmones el día siete p.i.. A continuación se exponen los resultados obtenidos por dichos autores:

- En hígado encuentran 5 +/- 2 larvas el día siete p.i., frente a las 95,6 totales de ese día, lo que supone un 5,23% respecto al total recuperado y un 0,25 % respecto al inóculo.

- En pulmones recuperan 7,6 +/- 3,7 larvas el mismo día, que equivalen a un 7,94% respecto al total y a un 3,8% respecto al inóculo.

- En músculo esquelético y encéfalo, encuentran que la mayoría aparece el día 20 p.i., concretamente 5,7 +/- 5,7 en músculo, que frente a las 234,7 totales, suponen un 2,42% y frente al inóculo un 0,28%.

- En cerebro recupera 222 larvas el día 20 p.i., equivalentes a un 94,58% respecto a las 234,7 totales y a un 11,1% respecto al inóculo.

DUNSMORE y col. (1.983) estudian la migración de T.canis en dos cepas murinas, Canberra y C57BL, inoculando 1.000 huevos de T.canis y utilizando una modificación del método del "spin" (JHONSTONE y col. 1.978) como método de recuperación. En ratones Canberra sacrificados a los 2, 4, 8, 16, 32, 49 y 122 días p.i., obtienen los siguientes resultados:

- En hígado el máximo aparece el segundo día p.i., encontrándose 160,4 +/- 11,2 larvas, que, frente a las 209,4 totales, suponen un 76,59% (16,04% respecto al inóculo).

- En pulmones la máxima recuperación tiene lugar el día tres p.i., con 21,2 +/- 2,6 larvas, que, frente a las 55,5 totales para ese día, suponen un 38,19% (2,1% respecto al inóculo).

- En músculo de la pata y de la canal, el máximo se recupera el octavo día p.i., con 1,7 +/- 9 larvas para la primera y 24,6 larvas para la segunda, lo que equivale a un 2,42% y a un 35,14% respectivamente, respecto a las 70 larvas totales encontradas ese día.

- En cerebro, las larvas se acumulan a lo largo de toda la experiencia y al final de la misma, día 122 p.i., aparece el máximo, 48,7 +/- 4,4 larvas, lo que supone un 92,23% respecto a las 52,8 larvas totales encontradas ese día (4,87% respecto al inóculo).

Al repetir la misma experiencia en ratones C57BL, sacrificados a los 2, 4, 8 y 50 días p.i., observan los siguientes resultados:

- El máximo en hígado aparece también el segundo día p.i., 148,2 +/- 12,7 larvas, un 88,87% respecto a las 178 totales de ese día (15,82% respecto al inóculo).

- En pulmones, el pico aparece más tarde, el cuarto día p.i., con 56,3 +/- 5,4 larvas, que suponen un 41,82% respecto a las 134,6 totales (0,56% respecto al inóculo).

- En músculo de la pata y de la canal, también es en el octavo día p.i., cuando aparece el máximo número de larvas, 5,0 +/- 0,9 en pata (4,80%

respecto al total), frente a las 104,1 totales de ese día y 45,9 larvas en la canal (44,09% respecto al total).

- En cerebro, la mayor cantidad de larvas se recupera al final de la experiencia, día 50 p.i., con 90,2 \pm 14,7 larvas, que, frente a las 102,6 totales encontradas ese día, equivale al 87,91%.

En una tercera experiencia, también con las dos cepas y con la misma dosis de huevos, pero procedentes de un cultivo diferente, observan que los ratones Canberra acumulan considerablemente más larvas en sus cerebros que en la experiencia anterior, cuando investigan la presencia de las mismas el día 16 p.i. (15,7 \pm 2,9 larvas para un cultivo de huevos frente a 57,6 \pm 10,6 larvas para otro cultivo diferente).

SHARMA y BHATIA (1.983) inoculan ratones con 500 huevos de T. canis por V.O., sacrificando los animales a intervalos distintos. Encuentran que las larvas comienzan a verse principalmente en intestino a las 24 horas y posteriormente en hígado, con una pequeña cantidad aislada en pulmones, cerebro y riñones. La recuperación total oscila entre el 6% y el 54,24%.

ABDEL-HAMEED (1.984, a, b) utilizando digestión péptica como método de recuperación, en ratones machos albinos de la cepa CD1, inoculados con 500 huevos embrionados de T.canis por V.O., encuentra los siguientes máximos:

- En hígado, el mayor número de larvas aparece el segundo día p.i., encontrando 300 larvas, que, frente a las 308 \pm 88 totales para ese día, suponen un 97,6% (60% respecto al inóculo).

- En pulmones, la mayor cantidad de larvas se encuentra el cuarto día p.i., con 33,39 larvas, equivalentes al 13,2% respecto a las 253 \pm 78 encontradas ese día (6,67% respecto al inóculo).

- El sexto día p.i. aparece el máximo número de larvas en la canal, donde se cuentan 199,55 larvas, que, frente a las 237 \pm 25 encontradas ese día, significa un 84,2% (39,9% respecto al inóculo).

- En cerebro la mayor concentración aparece el decimocuarto día p.i., con 57,55 larvas, lo que supone un 23,3% frente a las 247 \pm 42 larvas totales, (11,51% respecto al inóculo).

ABO-SHEHADA y col. (1.985), en un primer estudio, siguen la trayectoria de las larvas de T.canis desde la eclosión de los huevos hasta que atraviesan la pared intestinal. Utilizan ratón marrón consanguíneo

inoculado con 5.000 huevos infestantes, sacrificando cada hora, desde la primera hasta la octava p.i., y, a continuación, a las 14, 16 y 24 p.i.. Recuperan las larvas mediante lavados con solución salina del estómago e intestino delgado cuando están libres y con una digestión ácida si se trata de larvas histotrópicas.

Observan que las larvas eclosionan en el estómago, donde pueden permanecer hasta 24 horas, y en dos horas alcanzan todas las porciones del intestino delgado, siendo la mitad posterior el lugar preferido para la penetración. En sus experiencias el número de larvas libres en el lumen del intestino delgado alcanza un pico a las 4-6 horas p.i. y luego decae durante las siguientes 16 horas. Observan que las larvas penetran por la base de las criptas de Leiberkuhn y siguen rutas tortuosas en la lámina propia, entrando en la túnica muscular. A las dos horas p.i. recuperan las que penetran en la pared intestinal, cuyo número sube rápidamente con un pico a las 4-8 horas y luego disminuye hasta que a las 24 horas sólo encuentran un 1% de las larvas recuperadas de la pared intestinal.

Observan que, en su migración, sólo quedan retenidas en la submucosa y en la lámina propia por una reacción inflamatoria compuesta mayoritariamente por linfocitos y eosinófilos y siguen vasos linfáticos e invaden la cavidad peritoneal y el sistema vascular, aunque no aprecian su penetración en vasos sanguíneos intestinales.

Los mismos autores, en un trabajo posterior, (ABO-SHEHADA y HERBERT 1.985) estudian la migración postintestinal en ratones NIH. Observan que las larvas pasan a la fase visceral de la migración durante la primera semana y alcanzan hígado y pulmones, siendo el pico máximo en estos órganos los días dos y tres p.i. respectivamente. También recuperan, en este periodo, larvas de riñones (pico máximo los días cinco y seis p.i.), de médula espinal (recuperación máxima el séptimo día), de glándulas salivares (máximo el quinto día), de bazo (máximo el día dos p.i.) y de útero (máximo el tercer día p.i.).

Asimismo encuentran larvas migrando a través de cavidades corporales, especialmente en la cavidad peritoneal. Aprecian después, que se dispersan por todo el cuerpo y entran en la fase miotrópica-neurotrópica el día siete

p.i.. A partir de este momento encuentran la mayoría de las larvas en cerebro (máximo el día siete p.i.) y en musculatura (máximo el día 10 p.i.).

Cuando los estudios se extienden a lo largo de un año, observan que el número de larvas recuperadas va disminuyendo gradualmente.

Por otro lado al inyectar larvas directamente en cerebro, las recuperan de musculatura, hígado y pulmones los días tres, cinco y siete p.i.. A los tres y cinco días recuperan la mayoría de las larvas de pulmones y el día siete de cerebro. Esto demuestra, según los citados autores, que las larvas pueden migrar de nuevo desde cerebro a la fase visceral.

KOIZUMI y HAYAKAWA (1.984) comparan la migración larvaria de T.canis en seis cepas diferentes de ratones: BALB/c, C57BL/6, C3H/He, DBA/2, NC y BALB/c atímicos, a lo largo de los días 2, 6, 12 y 21 p.i.. Tras la administración oral de 400 huevos, encuentran que la media de larvas recuperadas en hígado a los dos días p.i. no es diferente según cepa, edad ni sexo (recuperan entre 150-170 larvas en hígado, lo que supone un 37,5-42,5% respecto al inóculo). Observan que el número de larvas en este órgano disminuye en todas las cepas los días 6, 12 y 21 p.i., pero la media para BALB/c y (NC x BALB/c) F1 es significativamente más alta que para C57BL/6, NC y BALB/c atímicos. Obtienen un número de larvas en la canal, el día 21 p.i., idéntico para todas las cepas incluyendo los ratones atímicos (BALB/c : 132,0 +/-19,5 larvas; BALB/c-nu/nu : 113,0 +/- 25; C57BL/6 : 116,5 +/- 14,5; C3H/He : 133,4 +/-18,8; NC : 130,6 +/- 6,3; diferencias no significativas). Asimismo observan que la media de larvas recuperadas de hígado el día seis p.i., aumenta con la edad en NC y BALB/c, aunque no aprecian diferencias en cuanto al sexo.

NICHOLAS y col. (1.984) inoculan ratones CBA con 500 huevos embrionados de T.canis y expresan los resultados de la recuperación larvaria como la media aritmética del número de larvas recuperadas por Baermann +/- la media del error estándar. Tres semanas después de la infestación encuentran 49,4 +/- 11,1 en la canal (9,88% respecto al inóculo) y 107,8 +/- 24,1 en cerebro (21,56% respecto al inóculo).

CONCEPCION y BARRIGA (1.985) infestan hembras de BALB/cJ con 2.000 huevos embrionados de T. canis para diversos estudios de protección,

sacrificando los animales a los cinco días p.i.. Tras someter a digestión péptica nódulos linfáticos, hígado, pulmones, canal y cerebro, recuperan un total de 282 larvas. Respecto a la distribución por órganos, encuentran el máximo en hígado del 31,91% (90 larvas), en la canal 29,78% (84 larvas), seguido de un 23,75% respecto al total en cerebro (67 larvas) y un 13,82% (39 larvas) en pulmones. En nódulos linfáticos encuentran dos larvas, lo que supone un 0,7% respecto al total recuperado.

BARRIGA y MYSER (1.987) inoculan ratones hembras de la cepa Balb/cByJ con 2.000 huevos embrionados de T.canis V.O.; los sacrifican a los 5, 20 y 33 días p.i. y recuperan las larvas por digestión péptica, encontrando los siguientes resultados:

- El máximo número de larvas en hígado, aparece el quinto día p.i., encontrándose 63 larvas, que suponen un 17,30% respecto a las 364 totales de ese día (3,15% respecto al inóculo).

- En pulmones también aparece el máximo el quinto día p.i., con 38 larvas, que equivalen al 10,43% respecto al total, y al 1,9% respecto al inóculo.

- En la canal, el mayor número de larvas se encuentra el día 20 p.i., donde el total de larvas recuperadas es de 577. Este máximo en la canal son 389 larvas, equivalentes al 67,4% respecto al total (19,45% respecto al inóculo).

- En cerebro el máximo se da el día 33 p.i., recuperándose 89 larvas que, frente a las 154 totales recuperadas ese día, suponen un 57,99% y un 4,45% respecto al inóculo.

Tras el exámen de sangre heparinizada de ratones infestados durante 10 días, encuentran tan sólo siete larvas; pero el lavado de la cavidad peritoneal y las vísceras abdominales arroja una media de 28 +/- 13 larvas, lo que confirma que T.canis puede migrar por rutas diferentes a la circulación.

WADE y GEORGI (1.987) estiman por métodos autorradiográficos el número de larvas de T.canis en diferentes órganos de ratones CD1 tras su infestación por V.O. con 100-200 larvas marcadas con ⁷⁵Se. Observan que el número total de larvas en todo el cuerpo muestra un curso descendente con el tiempo y que la canal acumula el mayor número de larvas, seguida de SNC, hígado y pulmones, en este orden. Pero cuando consideran el número de

larvas en relación a la masa corporal de tejido, distinguen cuatro grupos: I, SNC; II, hígado; III, pulmones, canal y riñones; IV, órganos genito-uritarios, piel e intestino. En cuanto a los máximos que detectan por órganos, se sitúan de la siguiente manera:

- En hígado observan unas 95 larvas como máximo el tercer día p.i., lo que supone un 47,5% respecto al total recuperado ese día, que son unas 200 larvas (47,5% respecto al inóculo).

- En pulmones observan el máximo también el tercer día p.i., encontrando unas 20 larvas, que equivalen al 10% respecto al total.

- En cerebro detectan la mayor cantidad de larvas el día 55 p.i., unas 40 larvas, lo que supone un 27,58% respecto a las 145 larvas totales detectadas ese día, (20% respecto al inóculo).

- En la canal, encuentran el máximo el día 28 p.i., con unas 105 larvas, que frente a las 145 totales, equivalen al 72,41%, (52,5% respecto al inóculo).

SUGANE y MATSUMURA (1.987) crean ratones quimera por radiación mutua y transplante de células de médula ósea entre cepas murinas con una alta y baja respuesta en términos de eosinofilia. En un primer grupo A, crean quimeras entre la cepa SJL (alta respuesta) y la cepa CBA (baja respuesta) y en un segundo grupo B, entre la cepa SWR (alta respuesta) y la cepa A/J (baja respuesta). Inoculan los ratones con 500 huevos embrionados de T. canis V.O. y buscan las larvas a los 18 días mediante digestión péptica, contabilizando el número total de larvas por ratón como la suma de las recuperadas de cerebro, músculo esquelético, pulmones, hígado, riñones, bazo y corazón.

Observan que en el grupo A, el número de larvas es ligera pero insignificamente mayor en la cepa SJL que en la cepa CBA ($p < 0,05$). Tampoco encuentran diferencias significativas en el número total de larvas recuperadas entre los ratones irradiados con ^{60}Co y reconstituidos con células de médula ósea singénicas, y los ratones singénicos no irradiados (SJL 101 \pm 13 larvas y SJL--SJL 103 \pm 18 larvas; CBA 73 \pm 11 larvas y CBA--CBA 82 \pm 10 larvas). Esto supone que el tratamiento de radiación al que se someten a los ratones para la producción de quimeras no afecta a la distribución larvaria. En cuanto a las cepas quimera obtenidas por irradiación con ^{60}Co y reconstituidas con células de médula ósea de la cepa diferente, encuentran que la media del número total de larvas es similar al de

la cepa donante (CBA--SJL 80 +/- 20 larvas y CBA 72 +/- 11 larvas; SJL--CBA 98 +/- 24 larvas y SJL--101 +/- 13 larvas). Por lo tanto estos autores concluyen que la distribución larvaria en ratones infestados por T. canis es controlada por células derivadas de la médula ósea.

PROCIV (1.989, a) estudia la migración de T. canis en la cavidad peritoneal de ratones inoculados con 5.000 huevos embrionados. Inmediatamente después del sacrificio, a las 16 horas p.i., observa muy pocas larvas en la cavidad peritoneal (8 +/- 2). Sin embargo, cuando los ratones permanecen cuatro horas muertos, recupera muchas más larvas de esta localización (485 +/- 105), comparable a las que escapan de los intestinos intactos incubados durante ese tiempo (305 +/- 57). Cuando mata los ratones a las 21 horas p.i., de nuevo muy pocas larvas aparecen en la cavidad peritoneal nada más sacrificarlos (14 +/- 3), pero recupera muchas después de la incubación del contenido abdominal (485 +/- 75). Según estos resultados, el autor concluye que la penetración a través de la pared intestinal hacia la cavidad peritoneal es una ruta minoritaria en el ciclo biológico de T. canis, y que las larvas abandonan el intestino rápidamente una vez que el hospedador ha muerto.

PROCIV (1.989, b) estudia la migración larvaria en la infestación oral y parenteral de P. poliocephalus con T. pteropodis, comparándola con T. canis. Cuando alimenta hospedadores jóvenes con una dosis alta de huevos de T. pteropodis, observa que las larvas eclosionan a través del tracto gastrointestinal, penetrando la mayoría por la mucosa de la mitad distal del intestino para alcanzar el hígado vía portal. Unas pocas entran en los vasos linfáticos para, eventualmente, alcanzar el hígado pasando a través de los pulmones y migrar traquealmente, o bien continúan en la circulación sistémica, pero nunca desarrollan infestaciones patentes. Cuando inocula los huevos por vía S.C., también eclosionan y las larvas alcanzan el hígado, viajando por la circulación a través de pulmones y otros tejidos. De nuevo, algunas sufren una migración traqueal.

Por otro lado, las larvas de T. canis, idénticas en tamaño a las de T. pteropodis, pasan a través de hígado y pulmones, dispersándose principalmente hacia músculo esquelético, pero acumulándose gradualmente en cerebro. Todo esto indica que la distribución de las larvas de Toxocara no depende de las dimensiones de las mismas.

Al inocular P. poliocephalus con 10.000 huevos embrionados de T. canis y sacrificarlos los días 7, 28 y 90 p.i., obtiene los siguientes resultados recuperando las larvas de hígado, pulmones, cerebro y músculo esquelético por el método descrito por PROCIV y BRINDLEY (1.986) consistente en una digestión salina: en hígado, pulmones y músculo esquelético, la mayor cantidad de larvas aparece a los siete días p.i., con 110, 83 y 1.200 respectivamente, lo que supone un 5,75%, 4,33% y 62,72% respecto a las 1.913 totales recuperadas ese día; en cuanto a cerebro, el máximo se detecta a los 90 días p.i., con 890 larvas que representan un 51,12% respecto a las 1.741 totales.

ABO-SEHADA y HERBERT (1.989) investigan la influencia de la cepa, sexo y edad de ratones en la infestación experimental con T. canis. Observan que dosis infestantes similares (1.000 y 2.000 huevos embrionados) provocan un mejor asentamiento de los parásitos en ratones de la cepa CD1 de, aproximadamente tres meses de edad, que en ratones de la cepa NIH, así como una mayor heterogeneidad de respuesta entre los individuos; sin embargo el número total de larvas recuperadas a los siete días p.i., resulta similar entre los machos y las hembras de la misma cepa. También observan una mayor retención hepática en machos de la cepa CD1 que en machos de la cepa NIH.

En cuanto a la edad, cuando utilizan ratones de más de tres meses, encuentran significativamente menos larvas en cerebro y más larvas en hígado, en los machos que en las hembras, y cuando infestan ratones jóvenes de ambas cepas, encuentran más diversidad en el asentamiento y patrones de migración entre individuos, que cuando utilizan animales más viejos. Respecto al sexo, al castrar a los machos observan niveles de infestación cerebral superiores y una menor retención larvaria hepática que en el mismo tipo de ratones macho intactos.

PAHARI y SASMAL (1.990) estudian la migración y distribución de las larvas de T. canis en los tejidos de codornices japonesas (Conturnix conturnix japonica) infestadas oralmente con 5.000 huevos embrionados, así como la capacidad de reinfestación de estas larvas en ratones inoculados con 50 de las mismas, obtenidas del hígado de las codornices.

Tras sacrificar los animales y digerir tracto digestivo, hígado, pulmones, corazón, bazo, riñones, músculo y canal, y contar las larvas, en el

caso de cerebro entre dos portaobjetos, observan que en las codornices, sacrificadas los días 10, 20 y 30 p.i., el 93-95% de todas las larvas recuperadas están en hígado y muy pocas llegan a músculo, cerebro y corazón. En los ratones, sacrificados el sexto y el décimosegundo día p.i., la mayor cantidad de larvas (once y diez respectivamente) se recuperan de la canal y, después, de músculo de la pata (seis y siete) y de cerebro (cuatro y ocho respectivamente). Por otra parte, obtienen muy pocas de hígado (dos y ninguna), pulmones (cuatro y dos) y vísceras (una y ninguna). Recuperan un 56% del inóculo en las codornices y un 54% en los ratones, no observando diferencias morfológicas entre las larvas obtenidas de ambos tipos de hospedadores.

2.9.- ECLOSION DE HUEVOS EMBRIONADOS Y OBTENCION DE LARVAS VIABLES

En la revisión bibliográfica realizada hemos encontrado distintos métodos para la obtención de larvas de Toxocara para su posterior utilización en diversas experiencias (obtención de antígenos, inoculación de animales, pruebas "in vitro", etc.).

HASS y TODD (1.962) eclosionan huevos de T.canis y T.cati tratándolos con una solución de anhídrido sulfuroso 0,1 M en agua destilada y otra de cloruro sódico 0,1 M y bicarbonato 0,1 M, gaseado con un 5% de anhídrido carbónico y un 95% de nitrógeno. Agitan a 40°C durante dos horas, consiguiendo una eclosión del 95% de los huevos y un 95-100% de larvas viables.

MACCHIONI y MARCONCINI (1.967) tratan huevos embrionados con una mezcla de hidróxido sódico al 2% e hipoclorito sódico al 2%, a partes iguales, durante 30 minutos. Tras agitación con perlas de vidrio durante 15-20 minutos, separan las larvas viables mediante el método de Baermann.

OLSON Y JONES (1.974) lavan los huevos con agua corriente y los ponen en contacto con una solución de cloruro de benzalconio al 3-4% durante 15 minutos para eliminar elementos contaminantes. Después lavan con solución de Ringer-lactato y eclosionan por presión entre dos portaobjetos. Tras resuspender en solución Ringer, separan las larvas viables de las cubiertas y huevos no eclosionados mediante gradiente térmico en un tubo en forma de "U".

DE SAVIGNY (1.975) decortica con hipoclorito sódico al 2% y finaliza la eclosión tratando con un agente reductor. Después de lavar con una solución antibiótica, recoge las larvas viables utilizando un aparato de Baermann. Un método similar utilizan STEVENSON Y JACOBS (1.977), quienes eliminan la cubierta externa con hipoclorito sódico y, tras finalizar la eclosión mediante anhídrido carbónico, purifican las larvas a través de gasa de algodón.

ROCKEY y col. (1.979) gasean directamente con anhídrido carbónico durante 30 segundos y rompen las cubiertas del huevo mediante agitación con perlas de vidrio. Para purificar utilizan el método de Baermann y posteriores lavados con soluciones antibióticas.

OAKS Y KAYES (1.979), tras decorticar con hipoclorito sódico, lavan con soluciones antibióticas y eclosionan en un homogeneizador. Para separar las larvas viables utilizan un algodón que introducen en una pipeta Pasteur dentro de un tubo con Medio RPMI-1640 a 37°C, gaseando anhídrido carbónico. El mismo procedimiento es utilizado por BADLEY y col. (1.987) para obtener larvas de T. canis a partir de la eclosión de los correspondientes huevos embrionados.

MATSUMURA y col. (1.981, a) evalúan la eficacia de cuatro métodos para la eclosión de huevos embrionados de T. canis y la obtención de larvas viables a partir de los mismos. En el primero tratan los huevos con hipoclorito sódico al 5,5% a 37°C durante tres horas para eliminar la cubierta más externa, agitando después durante 15 minutos. En el segundo, tratan con tripsina al 0,5%, a la misma temperatura y durante el mismo tiempo, para acabar agitando durante cinco minutos. En el tercer sistema tratan los huevos con P.B.S. 0,1 M en agitación magnética durante 24 horas a temperatura ambiente. En el cuarto los someten toda la noche a la acción de una mezcla de hipoclorito sódico e hidróxido sódico al 2% a partes iguales, suspendiendo después las larvas en P.B.S. 0,1 M tras el lavado. Posteriormente gasean la suspensión durante 15 minutos con nitrógeno a temperatura ambiente e incuban durante tres horas. Según dichos autores este último método consigue un 80% de larvas viables, el primero un 41% y los otros dos resultan totalmente ineficaces.

SMITH y col. (1.980, 1.981) decortican huevos embrionados de T. canis en hipoclorito sódico al 6-7% durante 20 minutos a 39°C. Tras lavar con P.B.S. para eliminar el cloro, finalizan la eclosión mediante bombeo con anhídrido carbónico.

KOIZUMI y col. (1.983) decortican con hipoclorito antes de romper mecánicamente los huevos en un homogenizador.

VAN KNAPEN y col. (1.983), tras decorticar con hipoclorito al 6%, exponen los huevos a la acción de anhídrido carbónico gaseoso durante unos minutos. Purifican las larvas viables con gasa de algodón, a través de la que pasan activamente, y recogen en Medio Mínimo Esencial de Eagle.

SUGANE y OSHIMA (1.984, b) eclosionan mediante la ayuda de un homogeneizador y tratan con soluciones antibióticas.

GUPTA (1.984) decortica con hipoclorito sódico al 10% y consigue la eclosión mediante gaseo de anhídrido carbónico en agitación constante. Para purificar utiliza el método de OAKS y KAYES (1.979), empleando Medio Mínimo Esencial de Eagle en lugar de RPMI-1640.

MAIZELS y col. (1.984) decortican por agitación a temperatura ambiente con hipoclorito sódico al 11%, lavan con agua destilada y bombean anhídrido carbónico al 5% y nitrógeno al 95% a 37°C. Purifican mediante Baermann, recogiendo las larvas al cabo de 45 minutos.

GUILLEN y col. (1.986, a) eclosionan huevos embrionados mediante tratamiento con una mezcla de hipoclorito sódico al 2% e hidróxido sódico al 2%, a partes iguales, finalizando el proceso de apertura mediante tratamiento mecánico con perlas de vidrio. Purifican las larvas viables mediante centrifugación con separador de linfocitos.

BRUNELLO y col. (1.986) también eclosionan los huevos con una mezcla a partes iguales de hipoclorito sódico al 2% e hidróxido sódico al 2% y, siguiendo el método de MATSUMURA y col. (1.981, a), los incuban durante toda la noche a 37°C. Después los lavan y resuspenden en P.B.S. (pH 7,6), gaseando la suspensión durante 15 minutos con nitrógeno gas e incubando durante tres horas a 37°C.

NICHOLAS y col. (1.986) eclosionan huevos de T.canis por el método de FAIRBAIRN (1.961) utilizado originalmente para eclosionar huevos de Ascaris lumbricoides. Para ello emplean un fluido que contiene sustancias reductoras en atmósfera de nitrógeno y anhídrido carbónico (95% + 5%), recogiendo las larvas viables en un aparato de Baermann.

AL-TAE y col. (1.987) realizan un estudio comparativo eclosionando huevos de T.canis por distintos procedimientos: a) con tripsina al 0,5% (bajo distintas condiciones: a 37°C, a 37°C gaseando con nitrógeno/anhídrido carbónico al 95/5%, y a temperatura ambiente, todo ello en agitación); b) con pepsina al 0,5% a 37°C gaseando con nitrógeno/anhídrido carbónico al 95/5%; c) con tampón fosfato a pH 7 y tampón fosfato salino a

pH 7,2, a temperatura ambiente y en agitación; d) con extractos naturales de tejido intestinal de ratón a 37°C y burbujeando con nitrógeno/anhídrido carbónico en una mezcla al 95/5%; e) con los extractos anteriores, más agentes reductores como anhídrido sulfuroso Tween 80; f) con extractos naturales de tejido intestinal de perro.

Concluyen que la aplicación a partes iguales de extractos de tejido intestinal de ratón, procedentes de estómago, de duodeno y de intestino delgado total, provocan el mejor nivel de eclosión. Afirman que este método parece especialmente útil cuando se necesitan cultivos grandes para producción de vacunas u otros objetivos, ya que las larvas así obtenidas resultan más activas y sanas que las obtenidas por métodos tradicionales.

BOWMAN y col. (1.987) siguen el método descrito por OAKS y KAYES (1.979) y DE SAVIGNY (1.975): lavan asépticamente los huevos con medio de cultivo RPMI-1640 tamponado a pH 7,2, con glutamina y gentamicina; eclosionan en un homogeneizador de vidrio a unas seis r.p.s. y con unos 18 golpes; a continuación purifican las larvas en un aparato de Baermann cuyo embudo se forra con tres láminas de papel para limpiar gafas y en cuyo fondo se coloca un trozo de algodón absorbente; cubren aproximadamente la mitad del algodón con el líquido a purificar y lo mantienen durante 12 horas a 37°C, con un 5% de anhídrido carbónico y un 95% de humedad; recogen las larvas, centrifugan y lavan con medio estéril.

WADE y GEORGI (1.987) eclosionan los huevos de T.canis previamente decorticados con hipoclorito sódico al 1% de la siguiente manera: tras lavarlos varias veces con solución salina estéril, sumergen los huevos en un medio de cultivo consistente en Medio 199 con glutamina, glucosa, penicilina-estreptomicina y suero bovino, y mantienen la suspensión en agitador magnético durante 20-24 horas a temperatura ambiente; purifican las larvas pasándolas a través de un filtro de malla 508 e incuban durante dos horas a 37°C; centrifugan el medio que contiene las larvas filtradas y eliminan el sobrenadante.

CASAROSA y col. (1.987) tratan los huevos embrionados con una mezcla de hidróxido potásico al 2% e hipoclorito sódico al 2%, a partes iguales, lavan repetidas veces con solución fisiológica y eclosionan los huevos decorticados por el método de FAIRBAIRN (1.961).

VAN GORP y col. (1.987) decortican los huevos de T. canis con hipoclorito sódico al 6% durante 45 minutos. Tras lavarlos, utilizan como medio de eclosión 2,5 ml de bisulfito sódico (0,1 mol/l) durante 10 segundos, seguido de bicarbonato sódico (114 mol/l) más 10 ul de ácido clorhídrico (11,4 mol/l). Dejan actuar esta mezcla en un agitador magnético durante dos horas, lavan y purifican las larvas por Baermann en medio RPMI-1640 con bicarbonato (29 mol/l), más 100 U.I./ml de penicilina y 100 ug/ml de esteptomicina.

ARES-MAZAS y col. (1.987) decortican los huevos embrionados de T. canis por la técnica de STEVENSON y JACOBS (1.977). Provocan la eclosión de los huevos mediante la acción del burbujeo de nitrógeno a través de la suspensión (30-60 minutos) y a continuación concentran mediante el método de Baermann.

BOYCE y col. (1.988, 1.989) lavan los huevos embrionados de T. canis tres veces con cloruro sódico al 0,85%, decorticándolos a continuación durante 30-90 minutos, sin agitación, a 37°C en una mezcla a partes iguales de hipoclorito sódico al 5,25% e hidróxido sódico al 1%. Paran el proceso cuando las capas más externas del huevo se han eliminado, quedando la membrana interna que se distorsiona por los movimientos de la larva. Después lavan los huevos cuatro veces con solución salina al 0,85% y los eclosionan en sales de Earle por el método descrito por URBAN y col. (1.981), que consiste en la apertura por agitación mediante perlas de vidrio. Purifican la suspensión larvaria con gasa de algodón estéril manteniéndola toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente recolectan asépticamente las larvas en alícuotas de 10 ml, lavándolas seis veces con tampón fosfato salino estéril de Dulbecco en caliente.

LYNCH y col. (1.988 a, b) eclosionan los huevos de T. canis mecánicamente y purifican posteriormente las larvas por migración a través de un aparato de Baermann.

ROBERTSON y col. (1.989) decortican los huevos embrionados de T. canis en hipoclorito sódico al 50%, antes de eclosionarlos en una atmósfera de bajo contenido en oxígeno.

SMITH (1.989) incuba los huevos de T. canis en una solución de hipoclorito sódico, con un 14% de cloro libre, hasta que el exámen microscópico revela profundas hendiduras en la cáscara del huevo, aproximadamente a los 20 minutos. Después filtra y lava los huevos y los transfiere a un homogeneizador manual de Griffith, necesitando de 10 a 16 golpes para romper los huevos decorticados y liberar las larvas.

HUWER y col. (1.989) sonicán huevos embrionados de T. canis, dejando después migrar las larvas según el método de Baermann-Wetzel, manteniéndolas finalmente en medio RPMI con 100 U.I./ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycinina.

WILLIAMSON y col. (1.990) tratan los huevos embrionados de T. canis con hipoclorito sódico al 5% hasta dejar sólo la capa más interna, lavando después abundantemente con agua. A continuación burbujan una mezcla de anhídrido carbónico al 5% y nitrógeno al 95% a través de la suspensión de huevos, mantenida a 37°C durante 30-60 minutos. Tras la eclosión, purifican las larvas por Baermann.

CROWCROFT y GILLESPIE (1.991) describen un método rápido para la eclosión de huevos embrionados de T. canis que permite obtener un número elevado de larvas viables de segundo estadio, sin necesidad de diseccionar las hembras individualmente. Estas se conservan durante un mes en formalina al 5% para conseguir la maduración de los huevos, lo que comprueban extrayendo del útero una muestra de los mismos e identificándolos al microscopio. A continuación trituran las hembras en un homogeneizador mecánico y lavan el resultante con agua destilada. Mezclan el sedimento a partes iguales con una solución de hipoclorito sódico (14% de cloro disponible) e incuban durante cinco minutos a temperatura ambiente. Tras lavar dos veces con agua destilada transfieren el sedimento a un aparato de Baermann, con lo que las larvas móviles migran y se recogen sobre medio RPMI. Por último eliminan el exceso de medio, aspiran las larvas asépticamente y las transfieren a medio fresco, incubándolas a 37°C.

2.10.- OBTENCION DE ANTIGENOS

2.10.1.- OBTENCION DE ANTIGENO TOTAL

2.10.1.1.- ANTIGENO TOTAL DE HUEVOS EMBRIONADOS

SHARP y OLSON (1.961) obtienen extractos de huevos de T. canis mediante centrifugación y homogeneización a 20°C. Posteriormente centrifugan para eliminar las cubiertas de los huevos no homogeneizados, utilizando el sobrenadante como antígeno.

IZZAT y OLSON (1.970) introducen la variante de la sonicación en baño de hielo, consiguiendo resultados más satisfactorios. A continuación liofilizan el extracto obtenido y lo conservan a -20°C. WONG y col. (1.976) añaden a la sonicación una extracción en P.B.S. durante toda la noche a 5°C.

CYPESS y col. (1.977) homogeneizan huevos embrionados en tampón borato 0,05 M, pH 8,6 y los centrifugan a 2.000 xg durante 30 minutos, utilizando el sobrenadante como antígeno. El mismo método de obtención es utilizado posteriormente por GLICKMAN y col. (1.979, 1.981, a), GALANT y col. (1.980) y GLICKMAN y SCHANTZ (1.985).

POLDERMAN y col. (1.980) tratan huevos embrionados con hidróxido sódico/hipoclorito sódico, homogeneizando después mediante sonicación y centrifugando a 4°C (90 minutos a 15.000 r.p.m.). Dializan el sobrenadante frente a agua destilada y liofilizan. Para su utilización redisuelven y precipitan con ácido tricloroacético o fosfotúngstico, neutralizan el sobrenadante con hidróxido sódico y diluyen en tampón carbonato 0,1 M y pH 9,6.

Utilizando cultivos en los que el 50% de los huevos están embrionados, OLSON y SCHULZ (1.980) preparan extractos antigénicos mediante homogeneización en baño de hielo.

SMITH y col. (1.983, b) obtienen antígeno de huevos embrionados mediante ruptura y posterior suspensión en P.B.S.. Después centrifugan a 16.000 r.p.m. durante una hora a 4°C y eliminan el sedimento.

CONCEPCION y BARRIGA (1.985) obtienen un extracto antigénico a partir de huevos embrionados de T. canis, lavándolos varias veces en solución salina y tampón fosfato a pH 7,2, suspendiéndolos en 10 ml del mismo tampón a una concentración de unos 40.000 huevos/ml y homogeneizando varias veces a 20.000 r.p.m.. A continuación los sonicán 15 veces durante 30 segundos y extraen la suspensión sonicada a 4°C durante 24 horas, centrifugan a 20.000 xg durante 30 minutos (realizando todo el proceso a 4°C, o en hielo) y utilizan el sobrenadante como extracto de huevos. Finalmente determinan la concentración proteica por el método de Folin-Lowry, (LOWRY y col. 1.951) utilizando seroalbúmina bovina (B.S.A.) como patrón.

ROMBERT (1.987) obtiene antígeno total de huevos embrionados de T. canis. Para ello suspende los huevos en solución salina y los sonica. Posteriormente centrifuga el producto resultante a 6.000 r.p.m. durante 30 minutos, utilizando el sobrenadante como antígeno y valorando el contenido proteico mediante el método de BRADFORD (1.976).

2.10.1.2.- ANTIGENO TOTAL LARVARIO

VIENS y col. (1.975) decortican huevos de T. canis con lejía doméstica, lavan con P.B.S. pH 7,2 y homogeneizan. Obtienen así una mezcla de huevos embrionados, huevos intactos y rotos, larvas libres y cubiertas vacías. Lavan este producto varias veces en solución salina y lo consideran antígeno larvario.

CYPESS y col. (1.977) homogeneizan larvas de segundo estadio en tampón borato 0,05 M, pH 9,6, centrifugan y utilizan el sobrenadante como antígeno. Esta misma técnica es utilizada por DESOWITZ y col. (1.981).

KOIZUMI y col. (1.983) preparan extractos de larvas de T. canis. Después de cortarlas en trozos pequeños y homogeneizar en P.B.S., sonicán el homogeneizado a 20 KHz durante cinco minutos. Tras centrifugar, dializan el sobrenadante frente a P.B.S..

NICHOLAS y col. (1.984) preparan antígeno a partir de larvas de T. canis procedentes de cerebros de ratones. Después de lavar con P.B.S., sonicán añadiendo fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2mM y ácido

etilendiaminotetrácetico (EDTA) 2 mM para evitar la proteólisis. Tras centrifugar, recogen el sobrenadante y determinan la concentración proteica espectrofotométricamente a 280 nm.

RIERA y col. (1.987, a) obtienen antígeno total larvario de T. canis por sonicación de larvas de segundo estadio, siguiendo la pauta recomendada por el Centre for Diseases Control de Atlanta (SCHANTZ).

2.10.1.3.- ANTIGENO TOTAL DE ADULTOS

IZZAT y OLSON (1.970) preparan antígeno total de adultos de T. canis por el método de HUNTLEY y MORELAND (1.963). Lavan los adultos en solución salina estéril y homogeneizan en batidora con P.B.S. 0,15 N, pH 7,2, durante 10 minutos. Extraen toda la noche a 50°C, liofilizan y conservan a -200°C. También utilizan el método de IVEY (1.965), que es similar al anterior, hasta la extracción a 50°C. A partir de este paso realizan dos centrifugaciones, una a 1.300 xg durante 90 minutos, y otra de 30 minutos a 10.000 xg. Tras liofilizar, el fluido sobrenadante lo conservan a -200°C.

ENAYAT y PEZESHKI (1.977) preparan antígeno total de T. canis mediante homogeneización a 40°C, obteniendo dos extractos. El sobrenadante recogido tras el centrifugado constituye el primer extracto antigénico; a continuación resuspenden el sedimento en P.B.S. y, tras sonicar y centrifugar, recogen el sobrenadante que constituye el segundo extracto antigénico.

CYPESS y col. (1.977) utilizan el mismo método de obtención que para extracto de huevos embrionados y larvas de segundo estadio.

El proceso de delipidación fué introducido por WELCH y DOBSON (1.978), quienes procesan los helmintos de la siguiente manera: lavan en solución fisiológica, cortan en piezas y homogeneizan. Tras fragmentar la pasta resultante por sonicación, delipidan con n-hexano, centrifugan y recogen el sobrenadante realizando todo el proceso a 40°C.

Este mismo método sigue siendo utilizado posteriormente por WELCH y col. (1.979, 1.983).

SMITH y col. (1.983, c) lavan adultos en P.B.S. y homogeneizan en baño de hielo. Después de solubilizar durante seis horas a 40°C, centrifugan una hora a 16.000 r.p.m. eliminando el sedimento.

TOHGI y col. (1.983) utilizan simples extractos salinos de adultos de T. canis y KOIZUMI y col. (1.983) emplean el mismo método de extracción que el utilizado para larvas de segundo estadio.

TANAKA y col. (1.983) preparan antígeno de T. canis a partir de fluido corporal de helmintos adultos. Realizan una punción del extremo posterior y filtran el fluido a través de papel Whatman nº 1. Después de dializar frente a agua destilada, liofilizan el antígeno.

CONCEPCION y BARRIGA (1.985) lavan los helmintos varias veces en solución salina y tampón fosfato pH 7,2, los cortan y suspenden 5 g. de material en 20 ml del tampón anterior. A continuación, homogeneizan varias veces en una batidora a unas 20.000 r.p.m. y, después, sonicen 10 veces durante 60 segundos a 185 vatios/cm². Extraen y centrifugan por el mismo sistema que para la obtención del extracto de huevos embrionados, valorando asimismo el contenido proteico por el método de Folin-Lowry, (LOWRY y col. 1.951).

GUNASEELAM y col. (1.986) obtienen antígeno, por el método descrito por CYPESS y col. (1.977), a partir de adultos de T. canis a los que previamente lavan repetidas veces con solución salina.

PETITHORY y col. (1.987) recogen adultos y lavan varias veces con solución salina. Los fragmentan mediante seis sucesivas congelaciones y descongelaciones. Para la extracción del antígeno hidrosoluble utilizan cloruro sódico al 1% preparado con agua bidestilada y finalmente dializan la solución antigénica durante 24 horas a 40°C y liofilizan.

2.10.2.- OBTENCION DE ANTIGENO EXCRETOR/SECRETOR LARVARIO

Fue DE SAVIGNY en 1.975 el que obtuvo por primera vez antígeno E/S cultivando larvas de segundo estadio de T. canis. Para ello dispersa las larvas recién eclosionadas y purificadas en medio Mínimo Esencial de Eagle

con sales de Hanks (HMEM), con 100 U/ml de penicilina y 250 ug/ml de estreptomycin en tubos de tapones de silicona. Incuba 10^4 larvas/ml en tubos con 5 ml de HMEM. Mantiene los cultivos a 37°C en agitación constante a 0,5 r.p.m.. Semanalmente examina los tubos y cuando presentan contaminación o la mortalidad supera el 5% desecha los cultivos. En los tubos de aspecto satisfactorio aspira el medio asépticamente y lo reemplaza por medio estéril. Centrifuga el medio para eliminar las larvas que pudieran haberse aspirado. Finalmente, dializa y concentra por presión positiva, seguida de liofilización, determinando la concentración proteica espectrofotométricamente a 280 nm.

CARRIER (1.982) mantiene larvas de segundo estadio en un medio libre de proteínas y extrae las sustancias de excreción-secreción liberadas por la larva mediante el método de DE SAVIGNY (1.975).

Posteriormente, en la misma línea, SMITH y col. (1.980; 1.981; 1.982; 1.983, a) filtran el medio por 0,45 μ m para eliminar las larvas transferidas accidentalmente al extraer el mismo. Concentran diez veces en Amicon con filtro YM 2, liofilizan y conservan a -70°C.

OSHIMA (1.983), MATSUMURA y ENDO (1.983), VAN KNAPEN (1.982; 1.983), obtienen el antígeno E/S de T.canis por la misma técnica, así como KOIZUMI (1.983), que determina la concentración de proteínas por el método de HARTREE (1.972) y la de carbohidratos según la técnica de ROE (1.955).

ABO-SEHADA y col. (1.985), tras utilizar el método de DE SAVIGNY (1.975), fraccionan el medio de cultivo que contiene los productos de excreción-secreción y lo concentran por liofilización hasta obtener 8 mg de proteína/ml, concentración estimada por el método de BIURET.

GUPTA (1.984) obtiene antígeno E/S cultivando las larvas en Medio Mínimo Esencial con antibióticos. Introduce alguna modificación, tal como ajustar el pH de los cultivos a 6,4-6,5, mantenerlos 24 horas en un incubador de anhídrido carbónico, cambiar el medio cada 15 días e incubarlos a 15°C. Tras purificar a través de filtros de 0,45 μ m, precipita con sulfato amónico saturado, redisuelve y dializa frente a solución salina.

SUGANE y OSHIMA (1.984, b) introducen la modificación de incubar cultivos en atmósfera de anhídrido carbónico al 5% a 37°C, determinando la concentración proteica por el método de LOWRY y col. (1.951). Este mismo método es utilizado por MAIZELS y MEGHJI (1.984), MAIZELS y col. (1.984), JENKINS y RICKARD (1.984) y ROBERTSON y col. (1.989).

NICHOLAS y col. (1.984, 1.986) utilizan el medio de Dubelcco, modificado por Eagle, aumentando la proporción de anhídrido carbónico al 10% y eliminando las sustancias de bajo peso molecular mediante ultrafiltración en Amicon.

SPEISER y GOTTSTEIN (1.984) introducen una diálisis frente a agua destilada y una ultrafiltración previas a la concentración.

GLICKMAN y col. (1.985) y GLICKMAN y SCHANTZ (1.985) modifican el método de DE SAVIGNY (1.975) cultivando las larvas en medio RPMI-1640, pH 7,2, suplementado con glutamina, a una concentración de 10^3 larvas/ml. Incuban en estufa con un 5% de anhídrido carbónico y una humedad relativa del 95%. Tras dializar el medio frente a tampón Tris 0,05 M de pH 8 con azida sódica al 0,02% y concentrar mediante ultrafiltración, determinan la concentración de proteínas a 280 nm frente a un patrón de B.S.A.. Posteriormente, BOWMAN y col. (1.987) utilizan el mismo método de obtención de antígeno E/S, pero filtrando el medio recolectado a través de papel Whatman nº 1 y dializando frente a P.B.S. 0,01 M de pH 7,2. También concentran por ultrafiltración, utilizando un límite de exclusión de 10.000 D, hasta llegar a obtener 2-10 mg/proteína/ml, valorados del mismo modo.

GUILLEN y col. (1.986, a) suspenden larvas viables en medio Mínimo Esencial de Eagle con sales de Earle, con bicarbonato a 2 g/l y glutamina 2mM, incubándolas a 37°C. Semanalmente recogen los sobrenadantes de los cultivos y, tras dializar frente a P.B.S., valoran su contenido proteico mediante el método de BRADFORD (1.976). El mismo método es utilizado por BRUNELLO y col. (1.986), quienes obtienen concentraciones de 70 ug/ml de antígeno, almacenándolo a -20°C hasta su uso.

MEGHJI y MAIZELS (1.986) y MAIZELS y col. (1.987) cultivan las larvas a una concentración de 4.000 larvas/ml en medio RPMI-1640, suplementado con glucosa al 1% y conteniendo penicilina, estreptomicina y HEPES. Incuban a

37°C en atmósfera de anhídrido carbónico al 5%, manteniendo los cultivos hasta ocho meses, comprobando microscópicamente la viabilidad de los parásitos. Recogen las fracciones semanalmente y concentran en Amicon YM 10, almacenándolas a -70°C hasta su uso. El mismo método es utilizado por KENNEDY y col. (1.987).

GENCHI y col. (1.987) cultivan las larvas recién eclosionadas en condiciones estériles en Medio Mínimo Esencial, conteniendo un 1% de glutamina, durante 30 días. Cada 10 días renuevan el medio, como describe DE SAVIGNY (1.975), y centrifugan los sobrenadantes recogidos, filtran por 0,45 µm y finalmente dializan frente a agua desionizada. Valoran la solución final por el método de LOWRY y col. (1.951) y la almacenan a -35°C hasta su uso.

CASAROSA y col. (1.987) mantienen las larvas en tubos de cultivo a 37°C en atmósfera de anhídrido carbónico al 5%, en solución de Hanks con sulfato de gentamicina.

LYNCH y col. (1.988, a, b) cultivan las larvas de T. canis a una concentración de 10^3 /ml en Medio Mínimo Esencial hasta que la viabilidad de las mismas decrece significativamente. Durante este periodo recogen regularmente el medio de cultivo, lo concentran por ultrafiltración y determinan la concentración de proteínas por el método de Folin-Lowry, LOWRY y col. (1.951).

EMBIL y col. (1.988) obtienen antígeno E/S del sobrenadante de los cultivos larvarios de T. canis en solución salina de Hanks, tal y como describe DE SAVIGNY (1.975).

BOYCE y col. (1.988) cultivan las larvas recién eclosionadas de T. canis en medio de Dubelcco modificado, a 37°C con un 5% de anhídrido carbónico. Recogen el medio semanalmente y lo dializan frente a P.B.S. pH 7,4; concentran y determinan la cantidad de proteínas por el método de BRADFORD (1.976).

RIERA y PORTUS (1.988) obtienen antígeno E/S de larvas de segundo estadio de T. canis siguiendo la técnica de DE SAVIGNY (1.975) y determinan la concentración de proteínas por el método de BRADFORD (1.976). La misma

técnica es utilizada por CONDE-GARCIA y col. (1.989) para la obtención del mismo antígeno.

WILLIAMSON y col. (1.990) mantienen larvas de segundo estadio de T. canis a una concentración de 6.000/ml usando una modificación del método original de DE SAVIGNY (1.975). Utilizan medio RPMI-1640 suplementado con HEPES 25 mM, 100 U.I./ml de penicilina y 100 U.I./ml de estreptomicina. Comprueban la viabilidad microscópicamente, así como la ausencia de contaminación bacteriana y fúngica por cultivo en agar sangre y agar-dextrosa Sabouraud respectivamente.

También PETITHORY (1.990) obtiene antígeno E/S de T. canis utilizando el medio RPMI-1640 para el cultivo de las larvas.

KOIZUMI y col. (1983) preparan antígeno E/S a partir de adultos de T. canis. Lavan cinco machos y hembras en solución salina estéril e incuban en 100 ml de P.B.S. con penicilina y estreptomicina a 30°C durante 18 horas. Cada tres horas cambian el medio y, posteriormente, concentran por presión.

2.11.- OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO

Tras múltiples estudios, está claro que las regiones variable e hipervariable de un anticuerpo (Abl) pueden, a su vez, actuar como determinantes antigénicos. La constitución antigénica de la región variable de una inmunoglobulina se considera como el **idiotipo** (Id) de ésta, y los determinantes antigénicos que constituyen el idiotipo se denominan **idiotopos** (ROITT, 1.986).

Teniendo en cuenta que el área de contacto entre el antígeno y el anticuerpo recibe el nombre de **paratopo**, hay que considerar la posibilidad de que algunos idiotopos se encuentran dentro del paratopo y otros fuera de éste. Es decir, que el sitio de unión del antígeno puede ser el mismo, o no, que el reconocido por un anti-idiotipo. En otras palabras: el **idiotipo(s)** puede, o no, estar asociado con la misma región estructural que el paratopo, en cuyo caso hablaremos de idiotopos relacionados, o no, con el sitio de unión del antígeno, o lo que es lo mismo, de **idiotopos paratópicos y no paratópicos** (HAY y col. 1.984).

Por otro lado, los idiotipos se pueden clasificar en dos grandes categorías: **idiotipos privados**, también llamados **IdI**, son determinantes que sólo se encuentran en los individuos en los que se han generado los Abl contra un antígeno específico. Este grupo de idiotipos se describieron inicialmente en las preparaciones de Abl inducidas en conejos (OUDIN y col. 1.963) y en humanos (KUNKEL y col. 1.963). Alternativamente, los determinantes **IdX**, también llamados **idiotipos públicos** o "crossreactivos", se encuentran en los Abl producidos en diferentes individuos o especies.

En 1.973, LINDENMAN, y, en 1.974, JERNE, propusieron teorías que describían el sistema inmunitario como una red de anticuerpos y linfocitos interaccionantes. La hipótesis original de la red idiotípica, ampliada por JERNE en 1.982, asigna diferentes valores a las interacciones **idiotipo-anti-idiotipo**. Los parámetros que se utilizan para definir los distintos tipos de anti-idiotipos son los siguientes: a) - Localización del **idiotopo diana** al cual se une el anti-idiotipo en relación con el sitio de unión; b) - Número de interconexiones con otros idiotopos en el repertorio **idiotípico**.

La localización del idiotopo diana se puede investigar utilizando el antígeno o haptenos como inhibidores en la unión del anti-idiotipo al idiotopo. Si no se observa inhibición, se asume que el idiotopo diana se encuentra distante del sitio de unión. Si el antígeno inhibe el idiotopo diana, se asume que está en el sitio de unión o cerca del mismo.

De acuerdo con JERNE y col. (1.982), se pueden diferenciar dos tipos de anti-idiotipos: Ab2 α y Ab2 β . La unión del Ab2 (anticuerpo anti-idiotipo) a su Abl (anticuerpo idiotípico) puede ser inhibida, o no, por el antígeno inductor del Abl; si no se inhibe dicha unión, este anti-idiotipo se denomina Ab2 α , el cual reconoce determinantes diferentes del sitio de unión del antígeno, pudiendo por tanto unirse al Abl al mismo tiempo que el antígeno. Sin embargo, un Ab2 β , o anti-idiotipo imagen interna, sí ve inhibida la unión a su Abl en presencia del antígeno correspondiente y, por ello, tiene la capacidad de mimetizar al mismo, pudiendo sustituirle e inducir una respuesta anti-antígeno.

La utilidad potencial de los anticuerpos anti-idiotipo en Parasitología se ve favorecida por el hecho de que el ciclo biológico de los parásitos implica la existencia de sistemas antigénicos complejos, lo que supone gran dificultad a la hora de identificar sistemas de antígenos universales que puedan ser utilizados para estimular el sistema inmunitario contra los parásitos. Además, el continuo desplazamiento de los antígenos de superficie de los parásitos hace que dichos antígenos no sean adecuados para el posible desarrollo de vacunas. Durante la infección cíclica se inducen anticuerpos frente a las variantes antigénicas que pueden resultar neutralizantes de variantes homólogas, no siéndolo de la variante original. Sin embargo los anticuerpos monoclonales anti-idiotipo, frente a anticuerpos protectores generados contra antígenos variantes, podrían inducir una fuerte inmunidad frente a la variante original.

SACKS y col. (1.982) obtienen anticuerpos anti-idiotipo policlonales (Ab2) frente a tres anticuerpos monoclonales (Abl) de clase IgG1 que reconocen tres antígenos de Trypanosoma rhodesiense. Para ello, inmunizan ratones SJL mediante inyección en la almohadilla plantar e inyección vía S.C. de 75 ug de una emulsión proteica purificada de cada uno de los tres anticuerpos Abl (7H11, 11D5 y B7B1) en dos veces el volumen de adyuvante completo de Freund, seguido dos semanas más tarde de 75 ug en solución salina.

Comienzan los sangrados dos semanas después del último recuerdo y los ensayan, mediante hemaglutinación, frente al idiotipo (Ab1) correspondiente, frente a inmunoglobulinas IgG de ratón BALB/c y frente a proteína de mieloma MOPC21, acoplados convenientemente a eritrocitos.

STEIN y SODERSTROM (1.984) producen un anticuerpo anti-idiotipo monoclonal (Ab2) 5868C, clase IgG1, frente a un anticuerpo monoclonal (Ab1) 150C8, clase IgM, obtenido a su vez, frente a un antígeno tipo polisacárido de la cápsula de Escherichia coli K13. Preparan los hibridomas anti-K13 en ratones BALB/cANN y utilizan uno de ellos, el 150C8, secretor de una IgM anti K13, para preparar el Ab2. En este caso utilizan ratones A/HeJ inmunizados con un precipitado formado por la incubación de 0,4 ml de ascitis, conteniendo el Ab1 150C8, con 0,4 ml de una solución de 1 mg/ml del antígeno K13, durante 24-48 horas en frío. Resuspenden el precipitado resultante de la centrifugación y lavado, en 0,4 ml de P.B.S., emulsionándolo con 0,4 ml de adyuvante completo de Freund que contiene el bacilo tuberculoso H37Ra. Inyectan los ratones por vía S.C. en las almohadillas plantares (0,05 ml/pata) y en los pliegues axilar e inguinal (0,025 ml en cada región). Realizan la primera inyección en adyuvante completo de Freund y las inyecciones semanales posteriores en adyuvante incompleto de Freund. Extirpan el bazo un día después de la séptima inyección, y lo utilizan para la fusión con la línea de mieloma SP2/20.

Seleccionan los anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) mediante un E.L.I.S.A. en el que tapizan con 50 ug/ml del antígeno Ps K13 durante una hora, añadiendo a continuación las ascitis del Ab1 150C8 a la dilución 1:50.000. A esta dilución las anti-inmunoglobulinas totales conjugados con fosfatasa alcalina reaccionan muy débilmente con el anticuerpo 150C8 (Ab1) y, sin embargo, lo hacen muy bien después de añadir el Ab2. Seleccionan el clon del anti-idiotipo 5868C (IgG1) y obtienen el Ab2 a estudiar mediante la producción de ascitis en ratones CAF1. Por último, ensayan la especificidad del Ab2 así producido mediante una inhibición de la hemaglutinación.

GRZYCH y col. (1.985) obtienen anticuerpos anti-idiotipo monoclonales (Ab2) frente al anticuerpo monoclonal (Ab1) IPLSml (específico para el antígeno 38K de S. mansoni). Para ello, inyectan ratas de la cepa LOU por vía S.C. con 1 mg de Ab1 purificado más 1 mg de inmunoglobulinas IgG humanas agregadas con glutaraldehído, en presencia de adyuvante completo de

Freund, con intervalos de dos semanas. Para seleccionar las ratas con una mejor respuesta utilizan el test de OUCHTERLONY (1.953), fusionando a continuación los esplenocitos de estos animales con células de la línea celular del mieloma IR983F. Seleccionan los sobrenadantes de los híbridos por su capacidad para inhibir la unión del Abl IPLSml marcado con ^{125}I , al antígeno 38K. De 200 hibridomas obtenidos seleccionan 29 sobrenadantes con niveles significativos de inhibición en dicha unión (>70%). El análisis de los sobrenadantes de los híbridos por OUCHTERLONY (1.953) demuestra que, en la mayoría de los casos (23/29), contienen anticuerpos de clase IgM. Por otro lado, la capacidad de inhibición por parte de estos sobrenadantes, de la unión del Abl IPLSml con el antígeno 38K, sugiere que los anticuerpos producidos son capaces de fijarse a un epítipo de IPLSml que está muy cerca o es parte del propio sitio de unión del antígeno, lo que indica que estos anti-idiotipos (Ab2) portan la imagen interna del epítipo original.

PERCY y HARN (1.988) obtienen anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) monoclonales frente al anticuerpo monoclonal E-1, obtenido a su vez frente a antígeno soluble de huevos y antígeno larvario de S. mansoni (SEA). Inmunizan ratones BALB/c con 3 ug de Abl en P.B.S. vía I.V. y con 20 ug de Abl en adyuvante completo de Freund en las almohadillas plantares, administrando tres semanas más tarde un recuerdo por vía I.V. del mismo modo, mientras que el recuerdo en la almohadilla plantar se hace en adyuvante incompleto de Freund. Una vez inmunizados convenientemente, sacrifican los animales a los tres ó cinco días de la última inyección, fusionando a continuación sus esplenocitos o células de nódulos linfáticos con la línea de mieloma NS-1, utilizando polietilenglicol como agente fusionante.

Una vez obtenidos los hibridomas secretores del anticuerpo monoclonal Ab2, los seleccionan en base a su capacidad para inhibir la unión del Abl con el antígeno correspondiente (SEA), mediante E.L.I.S.A.. Incuban los sobrenadantes de los hibridomas con el Abl durante 30 minutos a temperatura ambiente, permitiendo que el Ab2 presente forme inmunocomplejos, evitando así la posterior unión del anticuerpo monoclonal inicial (Ab1) a su antígeno. Sobre las placas tapizadas con 3,5 ug/ml del antígeno (SEA) añaden la mezcla resultante de la incubación (Ab2-Abl) y revelan con anti-inmunoglobulinas de ratón conjugadas con fosfatasa alcalina. Aquellos pocillos en los que la densidad óptica (D.O.) es menor que la del

sobrenadante control (sólo con el Ab1) en un 33%, o más, se consideran positivos para Ab2.

KRESINA y OLDS (1.988) obtienen suero anti-idiotipo (Ab2) en conejos a partir de un anticuerpo monoclonal murino (Ab1) 31-3B6, que reconoce una glicoproteína de 68 KD presente en un extracto de adultos de S. mansoni. Inmunizan tres conejos Nueva Zelanda con 5 mg del Ab1 31-3B6 purificado cromatográficamente y emulsionado en adyuvante completo de Freund, mediante inyección S.C. en numerosos puntos del lomo, axilas e ingles. Repiten la inmunización a las dos semanas con el Ab1 (31-3B6) purificado en adyuvante incompleto de Freund y continúan con dosis de recuerdo de 5 mg/conejo vía S.C., cada semana, hasta un total de ocho dosis. Una semana después de la última inmunización, sangran los animales y recolectan el suero.

Observan que el suero de los tres conejos produce una densa banda de precipitación en OUCHTERLONY (1.953) con el Ab1 (31-3B6) purificado y con inmunoglobulinas de BALB/c obtenidas de ratones previamente tratados con pristane y purificadas con sulfato amónico al 33%. Eliminan la actividad anti-isotipo y anti-alotipo presente en estos antisueros pasándolos a través de una columna de Sepharosa a la que se acoplan las inmunoglobulinas purificadas obtenidas en BALB/c. Sólo uno de los conejos produce un antisuero adsorbido que precipita en OUCHTERLONY (1.953) con el 31-3B6 (Ab1), formando una gruesa banda, y no con las inmunoglobulinas normales de BALB/c. Administran, por tanto, varias dosis de recuerdo a este conejo y sangran varias veces, consiguiendo un total de 200 cm³ de suero anti-idiotipo.

VELGE-ROSSEL y col. (1.989) obtienen anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) policlonales frente a un anticuerpo monoclonal (Ab1) de clase IgE, (B48-14), que reconoce antígenos de 56, 26 y 22 KDa de S. mansoni. Llevan a cabo la inmunización en ratas LOU/M, preparando el inmunógeno por tres procedimientos: a) precipitación del anticuerpo monoclonal (1 mg/ml) copolimerizado con inmunoglobulinas IgG humanas (5 mg/ml) en proporción 1/1, con un 25% de glutaraldehído (a lo que denominan antígeno del agregado B48-14); b) células secretoras del anticuerpo monoclonal fijadas con un 25 % de glutaraldehído; y c) el mismo anticuerpo monoclonal precipitado con sulfato amónico (1 mg/ml) en P.B.S.. Inyectan todos los preparados por vía S.C.. Para la primera inyección utilizan adyuvante completo de Freund, para

la segunda adyuvante incompleto de Freund, y las demás las hacen en P.B.S. cada dos semanas.

En una primera experiencia inyectan las ratas con el antígeno del agregado B48-14 (200 ug/rata); en la segunda experiencia inyectan los animales con 10^7 células secretoras del B48-14 fijadas del modo descrito y en la tercera administran el anticuerpo monoclonal purificado con sulfato amónico en P.B.S. (200 ug/rata). Sangran los animales cada dos semanas después de la primera inyección y recogen el suero por centrifugación, almacenándolo a -20°C . Para comprobar la especificidad del anti-idiotipo así obtenido, utilizan un E.L.I.S.A. "dot", enfrentándolo a 1 ul del anticuerpo monoclonal IgE (60 ug/ml).

KIM y col. (1.989) producen un anticuerpo anti-idiotipo (Ab2) monoclonal en ratones BALB/c inmunizados con el anticuerpo monoclonal 8D-3-6 (Ab1) purificado, el cual reconoce un epítipo del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Para ello, inmunizan los ratones vía I.P. con 100 ug del idiotipo 8D-3-6 en adyuvante completo de Freund, administran dos dosis de recuerdo en adyuvante incompleto de Freund con intervalos de tres semanas y, a las tres semanas siguientes, inmunizan de nuevo con 50 ug de Ab1 en P.B.S. 50 mM pH 7.2. Cuatro días después fusionan los esplenocitos de los ratones inmunizados con células de mieloma SP2/0-Ag14, utilizando polietilenglicol 1.500. Seleccionan los clones secretores de Ab2 mediante E.L.I.S.A., subclonan por dilución límite e inyectan los hibridomas en ratones tratados con pristane, provocando la subsiguiente ascitis. Recolectan el fluido ascítico y lo purifican por cromatografía de Proteína A-Sepharosa CL-4B.

Los clones secretores se seleccionan en base a la capacidad de unión de los sobrenadantes al anticuerpo idiotípico (Ab1), así como por su capacidad para inhibir la unión del anticuerpo idiotípico al antígeno específico.

PALOMO y col. (1.990) obtienen anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) policlonales en conejos, frente a anticuerpos monoclonales que reconocen la glicoproteína 47F o las glicoproteínas 63G, 62G ó 74G del virus sincitial respiratorio humano. Utilizan conejos blancos Nueva Zelanda a los que inyectan intradérmicamente, en múltiples sitios, 500 ug de fragmentos F(ab')_2

purificados de los anticuerpos monoclonales 47F (IgG1), 62G (IgG1) ó 63G (IgG2a), o la misma cantidad del anticuerpo 74G (IgM) purificado en un volumen igual de adyuvante completo de Freund. Cuatro y seis semanas después, administran dos recuerdos intramusculares de 100 ug del mismo material en adyuvante incompleto de Freund.

Recolectan el suero siete o diez días después de la última inyección y seleccionan los correspondientes anti-idiotipos pasando por columna de Sepharosa acoplada con inmunoglobulinas de ratón. Precipitan con sulfato amónico al 40% las inmunoglobulinas contenidas en cada suero anti-idiotipo adsorbido y este material es el que utilizan para la caracterización del Ab2. Esta se realiza ensayando la afinidad del suero anti-idiotípico frente a su Ab1 correspondiente y la capacidad del mismo suero para inhibir la unión del Ab1 a su antígeno, ambas mediante E.L.I.S.A..

2.12.- INMUNIDAD

2.12.1.- TECNICAS DE DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO

2.12.1.1.- TECNICAS QUE DETECTAN LA INMUNIDAD HUMORAL

2.12.1.1.1.- Detección de anticuerpos

Una de las primeras referencias bibliográficas sobre el diagnóstico inmunológico de la toxocarosis es la de OLSON (1.960), quién utiliza la técnica de **microprecipitación larvaria** "in vitro". Añade 3-24 larvas móviles de T.canis y A.suum a 0,01 ml de suero con 5 ug de estreptomicina. Coloca estas preparaciones en portas excavados en gota pendiente e incuba a 37°C, observando microscópicamente la formación de inmunoprecipitados en los orificios oral y excretor de las larvas.

RICHARDS y col. (1.962), una vez puesta a punto la técnica de microprecipitación larvaria, siguen utilizándola para la detección de anticuerpos específicos anti-T.canis en niños.

Posteriormente, STEVENSON y JACOBS (1.977) utilizan microprecipitación larvaria para estudiar sueros de cerdos infestados por T.canis. Preparan una suspensión de larvas (15-25 larvas/0,025 ml) e inactivan los sueros 30 minutos a 56°C. Después de añadir a cada pocillo 0,05 ml de suero y 0,25 ml de la suspensión de larvas, colocan en cámara húmeda a 37°C durante tres horas y examinan la presencia de precipitados en el poro excretor. Consideran reacción positiva cuando hay cinco o más larvas con precipitados.

Diferentes autores emplean otras reacciones de precipitación para intentar la detección de anticuerpos específicos:

RODRIGUEZ BURGOS (1.961) utiliza la reacción de precipitación en tubo. Emplea como antígeno líquido celómico o extracto total de adultos de T.canis al 2%, diluido en solución salina a las diluciones 1/500 y 1/1.000. Cuando con algunos antígenos y determinados sueros sospecha un fenómeno de

zona por exceso de antígeno, comprueba diluciones seriadas del mismo desde la 1/1.000 a la 1/10.000. Para efectuar la prueba utiliza tubos de hemólisis superponiendo suero y antígeno, incubando a la temperatura del laboratorio, haciendo una lectura a la hora y a las cuatro horas y expresando la positividad de la reacción como +++, ++ y +, de acuerdo con la precocidad, densidad y grosor del anillo blanquecino del precipitado formado en la interfase de los líquidos.

TRIBOULEY-DURET y col. (1.976) utilizan extractos antigénicos delipidados de adultos de T.canis para la detección de anticuerpos en conejos y ratones infestados experimentalmente mediante precipitación de OUCHTERLONY (1.953).

ENAYAT y PEZESHKI (1.977) emplean contraelectroforesis (C.I.E.) para investigar anticuerpos en cobayas inoculados con T.canis. Utilizan agar noble al 1,5% en tampón barbital pH 8,6 y tiñen con negro de naftaleno en ácido acético al 5%. En sus condiciones experimentales observan que la dilución óptima de los antígenos totales (5 y 3 mg/ml) es 1/4.

GLICKMAN y col. (1.978), para el diagnóstico de la L.M.V., utilizan la doble difusión de OUCHTERLONY (1.953), considerando positivo si la reacción de precipitación produce una banda idéntica a un control positivo de L.M.V..

DESOWITZ y col. (1.981) estudian anticuerpos frente a T.canis en sueros de niños. Para la determinación de IgG emplean C.I.E. con agar noble al 0,75% en tampón barbital 0,05 M, pH 8,6.

KOIZUMI y col. (1.983) estudian en ratas distintos métodos serológicos con diversos preparados antigénicos de T.canis. Realizan OUCHTERLONY (1.953) con agarosa al 1,4% en tampón veronal pH 8,6, e inmunolectroforesis a voltaje constante. Para inmunodifusión radial utilizan agarosa impregnada en antígeno E/S a una concentración de 4,5 ug/ml, añadiendo 3 ul de suero problema y tiñendo con azul de Comassie.

LUKES y PROKOPIC (1.984) investigan anticuerpos en conejos inoculados experimentalmente con huevos de T.canis, Toxascaris leonina y A.suum mediante C.I.E. con extractos antigénicos a una concentración de 2 mg/ml.

PETITHORY y col. (1.987, 1.990), ponen a punto un método de diagnóstico diferencial entre retinoblastoma y T.O., buscando anticuerpos específicos. Utilizan para ello, métodos de precipitación en gel de agarosa, con tampón Tris-veronal, pH 9,2 y fuerza iónica 0,05: micro-OUCHTERLONY, electrosinéresis e inmunolectroforesis. Utilizan la electrosinéresis con humor acuoso y antígeno de adultos de A. suum para obtener resultados preliminares en 24 horas. Después emplean un test de OUCHTERLONY (1.953) en paralelo con 20 ul de líquido endocular en el pocillo central y distintos antígenos en los pocillos periféricos: antígeno de adultos de A. suum, de adultos de T. canis, antígeno E/S de T. canis y de T. cati. Con este método no obtienen resultados definitivos hasta los ocho ó 10 días. Eventualmente practican una inmunolectroforesis de confirmación, con suero concentrado tres veces por liofilización. En todos los casos, lavan los portas con agitación durante cuatro horas en una solución de citrato sódico al 5% para eliminar las reacciones de la proteína C, lavan de nuevo, secan y tiñen con negro amido.

Entre las reacciones de precipitación también podemos incluir los ensayos de radioinmunoprecipitación que utilizan antígeno marcado con isótopos radiactivos.

MAIZELS y MEGHI (1.984) estudian sueros de perros experimentalmente infestados con huevos de T.canis mediante radioinmunoprecipitación. Posteriormente identifican los antígenos reconocidos por los anticuerpos caninos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Esta misma técnica es utilizada por SUGANE y col. (1.985) con sueros humanos. Incuban 20 ul de antígeno (E/S o somático) con un volumen igual de suero a 49C toda la noche. Posteriormente arrastran los inmunocomplejos con Staphylococcus aureus Cowan 1 y realizan SDS-PAGE.

KENNEDY y col. (1.987) utilizan también la radioinmunoprecipitación con S.aureus fijados con formalina o proteína A-Sepharosa como fase sólida absorbente. Sobre 50 ul de P.B.S. con un 0,5% de Triton X-100 añaden el antígeno E/S de T.canis marcado y 2,5 ml del suero a ensayar. Tras la

incubación toda la noche a 40°C, añaden 50 ul de la suspensión bacteriana al 10% o de proteína A-Sepharosa. Incuban la mezcla una hora a temperatura ambiente, con agitación ocasional y después la mantienen dos horas a 40°C. Lavan las bacterias tres veces en frío, miden la radioactividad y preparan el sedimento para un SDS-PAGE posterior. Este método selecciona anticuerpos del tipo IgG.

Un año más tarde ROBERTSON y col. (1.988) emplean este método descrito por KENNEDY y col. (1.987) para la detección de anticuerpos anti-Toxocara. Incuban el suero con el antígeno E/S radiomarcado durante toda la noche a 40°C, y precipitan los complejos antígeno-anticuerpo usando proteína A de S.aureus, lavando abundantemente y efectuando el recuento con un contador gamma.

Otras pruebas utilizadas son las de intradermorreacción. Así WONG y col. (1.976) inyectan extracto de huevos embrionados de T.canis y A.suum en el dorso de animales previamente sensibilizados con antígeno de estos parásitos, efectuando las lecturas a las 4, 24 y 48 horas.

KHALIL y col. (1.976, a) y KHALIL (1.977) investigan la prevalencia de toxocarosis en niños, mediante intradermorreacción. Inyectan 0,1 ml de antígeno total de adulto a la dilución 1/1.000 y leen 36 horas después, considerando reacción positiva cuando el diámetro es superior a 12 mm.

CRANDAL (1.976) estudia la respuesta de anticuerpos anti-T.canis en ratones, mediante anafilaxia cutánea pasiva (P.C.A.) utilizando fluido perientérico en azul de Evans como antígeno. Realiza la lectura a las dos horas para IgG1 y 72 horas para IgE.

HOGARTH-SCOTT y FEERY (1.976) realizan pruebas de P.C.A. con extractos antigénicos de T.canis parcialmente purificados. Cuantifican la reacción desde un diámetro de 5 mm (+) hasta 20 mm (+++).

ROCKEY y col. (1.981) estudian casos de T.O. mediante la investigación de IgE específica por P.C.A.. Inyectan suero o humor acuoso en la piel de cobayas seguido de la inyección de extracto de adultos de T.canis o A.suum en azul de Evans.

SUGANE y OSHIMA (1.984. a) investigan la presencia de IgE frente al antígeno E/S de T.canis en ratones infestados, mediante la reacción de P.C.A.. Posteriormente tratan a 56°C todos los sueros que dan reacción positiva y repiten con ellos la técnica.

También se han intentado las reacciones de aglutinación para el diagnóstico de la L.M.V..

HOGART-SCOOT y FEERY (1.976) emplean la técnica de hemaglutinación indirecta (H.A.I.). Sensibilizan glóbulos rojos de carnero formolados con extractos antigénicos de Toxocara y Ascaris (1,5 mg/ml) y los utilizan como antígeno para estudiar sueros de ratas infestadas por estos ascáridos. Tras 2-4 horas a temperatura ambiente, observan la presencia o ausencia de aglutinación mediante una escala arbitraria de + a ++++.

TRIBOULEY-DURET y col. (1.976) utilizan extractos antigénicos delipidados para la detección de anticuerpos en conejos y ratones inoculados con T.canis, mediante H.A.I.. Esta misma técnica también es utilizada por ENAYAT y PEZESHKI (1.977) con suero de cobayas, comprobando que en sus condiciones, la dilución óptima del antígeno total utilizado (3 mg/ml) para sensibilizar los glóbulos rojos de carnero es de 1/128.

Otros autores como GLICKMAN y col. (1.978) también utilizan H.A.I. así como floculación con bentonita (F.B.) para el diagnóstico de la L.M.V..

SUGANE y OSHIMA (1.983) utilizan aglutinación con látex. Fijan antígeno E/S de T.canis parcialmente purificado a partículas de látex y las añaden a 0,025 ml de diluciones de suero, mezclan e incuban 24 horas a temperatura ambiente.

Quizá el grupo más importante de reacciones inmunológicas, es aquel que utiliza **antisueros marcados** para el revelado de las mismas. Todas ellas han sido ampliamente utilizadas por diversos autores en el estudio de la toxocarosis.

Así por ejemplo, y en cuanto a las técnicas de **inmunofluorescencia**, que emplean antisueros marcados con sustancias fluorescentes, BAUFINE-DUCROCO y col. (1.974) utilizan la inmunofluorescencia indirecta

(I.F.I.) para el diagnóstico de la L.M.V.. Para ello, introducen huevos embrionados de T.canis en un intestino de ratón o de criceto, atan el fragmento intestinal, lo congelan a -20º C y cortan en un criostato. Como coloración de contraste utilizan azul de Evans, observando que las secciones de larvas de segundo estadio presentan fluorescencia verde si la reacción es positiva, y roja si es negativa. Indican que la cubierta externa del huevo aparece marrón rojiza, la interna amarilla autofluorescente y que los huevos embrionados no son fluorescentes.

VIENS y col. (1.975) estudian sueros humanos mediante I.F.I., aplicando diluciones seriadas de los mismos, comenzando desde la 1/10 y utilizando como conjugado, anti-inmunoglobulinas humanas marcadas con fluoresceína en azul de Evans. Observan que con los sueros positivos aparece fluorescente la larva y la cubierta interna del huevo, o la cutícula y el espacio subcuticular cuando se trata de secciones de adultos. Expresan los títulos como la recíproca de la última dilución que produce reacción positiva.

ANNEN y col. (1.975) mediante I.F.I. detectan anticuerpos frente a T.canis y A.suum en conejos, utilizando secciones en congelación de larvas de T.canis.

RUITENBERG y BUYS (1.976) emplean negro de ericromo como contracolorante en inmunofluorescencia. Como criterio de fluorescencia específica utilizan la correspondiente a la de la cutícula de las larvas de T.canis. Algunas veces, la hipodermis, la capa muscular y otras estructuras internas, muestran fluorescencia, que dichos autores consideran, fluorescencia no específica.

STEVENSON y JACOBS (1.977) investigan sueros de cerdos infestados por T.canis, T.cati, y A.suum mediante I.F.I.. Preparan antígeno de larvas de segundo estadio utilizando la suspensión de cutículas fragmentadas resultante de la sonicación. Consideran reacción positiva cuando aparece fluorescencia verde en los fragmentos cuticulares.

JACOBS y col. (1.977) también utilizan esta técnica para detectar anticuerpos frente a T.canis en el suero de empleados de perreras.

WELCH y DOBSON (1.978) y WELCH y col. (1.979; 1.983) conjugan los sueros problema con isotiocianato de fluoresceína para inmunofluorescencia directa (I.F.D.), empujando secciones de larvas de T.canis y A.suum. También realizan I.F.I. con antígeno total y anti-inmunoglobulinas humanas conjugadas con fluoresceína. Consideran reacción positiva a diluciones superiores a la 1/16, dando valores según la fluorescencia, de + (poca), ++ (media) y +++ (fuerte).

ROCKEY y col. (1.981) inoculan cobayas intravitrealmente con larvas de T.canis y A.suum y detectan anticuerpos IgG mediante I.F.I., usando como conjugado anti-IgG de cobaya marcadas con fluoresceína.

CRITCHLEY y col. (1.982) detectan anticuerpos anti-T.canis en suero de epilépticos mediante I.F.I., utilizando como antígeno una suspensión sonicada de larvas de segundo estadio.

SMITH y col. (1.983, b) también emplean I.F.I. con secciones de adultos de T.canis, T.leonina, A.lumbricoides y A.suum para estudiar reacciones cruzadas con sueros de conejos inoculados experimentalmente.

La mayoría de los autores en los últimos años emplean la técnica de E.L.I.S.A., (que utiliza antisueros marcados con enzimas), con distintos preparados antigénicos para el diagnóstico de la L.M.V..

Una de las primeras referencias bibliográficas encontradas es la de GLICKMAN y CYPESS (1.977) quienes investigan mediante E.L.I.S.A. la presencia de anticuerpos (IgG) anti-T.canis en empleados de clínicas veterinarias. Utilizan antígeno preparado a partir huevos embrionados de Toxocara y absorben el suero, previamente al análisis, con extracto de larvas de Ascaris para eliminar falsos positivos debidos a reacciones cruzadas entre antígenos presentes en Toxocara y anticuerpos anti-Ascaris, anticuerpos heterófilos y proteína C-reactiva. Realizan lectura visual, considerando el punto final como la inversa de la última dilución que produce distinto cambio de color.

CYPESS y col. (1.977) estudian sueros de pacientes mediante una modificación de la técnica E.L.I.S.A. de ENGEVALL Y PERLMAN (1.972), tapizando los pocillos mediante la adición de 50 ul de antígeno total de T.canis y

A.suum a la concentración de 2,5 ug/ml. Diluyen los sueros seriadamente y después de incubarlos durante 16 horas a temperatura ambiente, añaden anti-IgG humanas conjugadas con peroxidasa, utilizando como sustrato o-dianisidina. Absorben con extractos de A.suum aquellos sueros ensayados para la detección de anticuerpos específicos frente a antígenos larvarios de T.canis, y para eliminar la absorción inespecífica del suero a la placa, añaden los sueros sobre placas que contienen tampón carbonato en lugar de antígeno.

RUITENBERG y VAN KNAPEN (1.977) utilizan la técnica de E.L.I.S.A. con extractos de adultos de T.canis, diluyendo los sueros a la 1/100 en P.B.S. con B.S.A. al 1%.

Posteriormente GLICKMAN y col. (1.978) intentan establecer una correlación entre el criterio de presunción y las técnicas inmunológicas E.L.I.S.A., OUCHTERLONY (1.953), F.B. y H.A.I.. Estudiando 110 sueros humanos sitúan el título diagnóstico de E.L.I.S.A. en el logaritmo en base dos, igual o superior a cinco y, una vez comparados los resultados, concluyen que la sensibilidad de E.L.I.S.A. es de un 78,3% comparada con el 18,2%, 25,8% y 65,2% de H.A.I., F.B. y OUCHTERLONY (1.953), respectivamente. El valor predictivo de la prueba positiva es mayor del 85% para todas las pruebas excepto para H.A.I., mientras que el valor predictivo de la prueba negativa es mayor del 85% solamente en E.L.I.S.A.. Así mismo, comprueban que los resultados en E.L.I.S.A. son reproducibles en distintos laboratorios, con lo cual estos autores, concluyen que E.L.I.S.A., utilizando antígeno larvario, es el método de elección para el diagnóstico de la L.M.V..

CYPESS y GLICKMAN (1.978) afirman que absorbiendo los sueros humanos con extractos de huevos embrionados de A.suum, E.L.I.S.A. con extracto de huevos embrionados de T.canis, presenta un 78% de sensibilidad y un 92% de especificidad.

GLICKMAN y col. (1.981, a) estudian mediante esta técnica muestras de sueros de niños de 1-6 años considerando positivos títulos superiores a 1/8. Estos autores en el mismo año, investigan la presencia de anticuerpos específicos en sueros de perros mediante E.L.I.S.A. con antígeno de huevos embrionados de T.canis. Para sensibilizar las placas utilizan una

concentración de antígeno de 2,5 ug/ml en tampón carbonato 0,1 M, pH 9.6 y absorben los sueros con extracto de huevos de A.suum a una concentración de 4 ug/ml, leyendo visualmente el cambio de color tras una incubación a temperatura ambiente (GLICKMAN y col. 1.981, b).

VAN KNAPEN y col. (1.982, 1.983) detectan anticuerpos anti-T.canis en sueros humanos y sueros de monos mediante la técnica E.L.I.S.A.. Utilizan una concentración empírica de antígeno E/S (dilución 1/1.000 en tampón carbonato del medio liofilizado donde se mantienen las larvas). Para los sueros emplean diluciones dobles empezando desde la 1/20 en P.B.S. con B.S.A. al 2% y Tween 20 al 0,05%. Consideran positivos aquellos sueros que presentan D.O. tres veces la desviación standard de la D.O. media obtenida para los sueros negativos.

POLLARD (1.979) utiliza E.L.I.S.A. para el diagnóstico de la T.O. con extracto de huevos embrionados de T.canis. Diluye los sueros desde la 1/2 a la 1/512 previamente absorbidos con extractos de A.suum. Considera el punto final como la última dilución que produce cambio de color.

SCHANTZ y col. (1.979) utilizan E.L.I.S.A. con extracto de huevos embrionados para la detección de IgG específica en el diagnóstico de la T.O., considerando el punto final como el autor anterior.

POLDERMAN y col. (1.980) diagnostican toxocarosis humana mediante E.L.I.S.A. con antígeno total larvario a una concentración de 50 ug/ml e interpretan los resultados visualmente después de 30 minutos de incubación del sustrato. El mismo método es utilizado por GALANT y col. (1980) absorbiendo previamente los sueros humanos con extractos de huevos embrionados de A.suum.

FELBERG y col. (1.981) utilizan E.L.I.S.A. con antígeno de huevos embrionados para el diagnóstico de la T.O.. Por disponer de muy poca cantidad de humor acuoso, sólo realizan una dilución (1/8), a la que consideran como el mínimo título diagnóstico en T.O..

GRELCK y col. (1.981) estudian reacciones cruzadas entre T.canis y A.suum en cerdos inoculados con huevos embrionados, mediante una modificación de la técnica E.L.I.S.A. de CYPESS y col.(1.977). Utilizan el antígeno

(extracto de adultos y huevos) a una concentración de 10 ug/ml y los sueros, absorbidos con 200 ug de proteína antigénica heteróloga/ml, a la dilución 1/50 en P.B.S.-Tween 20 al 0,2%. Como sustrato para la peroxidasa utilizan o-toluidina y realizan la lectura espectrofotométrica a 620 nm.

YANG y col. (1.982) utilizan E.L.I.S.A. con antígeno E/S de T.canis para estudios serológicos en personal veterinario, considerando un título igual o superior a 1/10 como diagnóstico de reciente o pasada infestación. También prueban los sueros frente a A.suum en E.L.I.S.A. con antígeno total larvario y absorben los que dan positivos en este sistema con antígeno de Ascaris, antes de repetir la serología frente a Toxocara.

SMITH y col. (1.982) estudian la respuesta serológica en conejos infestados con T.canis y T.leonina mediante E.L.I.S.A. con antígeno de huevos embrionados a 8 ug/ml y antígeno E/S a 7,6 ug/ml. Ensayan los sueros diluidos desde 1/100 a 1/204.800 y, como sustrato para la fosfatasa alcalina, emplean p-nitrofenilfosfato. Después de frenar con NaOH 1N y leer a 405 nm, consideran positivas D.O. superiores a 0,500.

CARLIER y col. (1.982) realizan E.L.I.S.A. en tubo con antígeno E/S, empleando los sueros a la dilución 1/500. Como sustrato para la peroxidasa emplean o-dianisidina, frenan con ClH 5N y leen a 405 nm.

MATSUMURA y ENDO (1.982, b) utilizan E.L.I.S.A. con antígeno E/S de T.canis a 20 ug/ml para analizar sueros de niños. Como conjugado emplean anti-inmunoglobulinas humanas marcadas con peroxidasa, como sustrato ácido 5-aminosalicílico y, después de frenar con NaOH 1N y leer a 450 nm, consideran positivos aquellos sueros que a la dilución 1/160 presentan D.O. igual o superior a 0,200, siempre y cuando los controles negativos tengan valores inferiores a 0,100. También MATSUMURA y ENDO (1982, a) investigan anticuerpos anti-T.canis en perros infestados de manera natural, utilizando como antígenos extractos de huevos embrionados, larvas, adultos y productos de excreción-secreción, a las concentraciones de 32, 12, 80 y 20 ug/ml respectivamente, y los sueros a la dilución 1/40.

Posteriormente, MATSUMURA y ENDO (1.983) utilizan este sistema para investigar anticuerpos en población adulta, empleando antígeno E/S a 28

ug/ml y considerando positivos los sueros que, a la dilución 1/160, presentan D.O. superiores a 0,200 y negativos inferiores a 0,060.

TÖNZ y col. (1.983) investigan la prevalencia de toxocarosis con sueros de niños mediante E.L.I.S.A. con antígeno E/S, considerando positivos los sueros que a la dilución 1/160 presentan D.O. superiores a 0,700, dudosos entre 0,500 y 0,700 y negativos inferiores a 0,500.

WALKER y col. (1.983) recomiendan la utilización de E.L.I.S.A. en el diagnóstico de la T.O., considerando positivos los casos en los que la D.O. del problema (humor acuoso y vítreo) es tres veces la del testigo negativo.

La misma técnica es utilizada por BRUNELLO y col. (1.983) para detectar IgG específica frente al antígeno E/S de T.canis, procesando los sueros de los pacientes a la dilución 1/20. GENCHI y col. (1.983, a, b), mediante este sistema, consideran positivo a partir de dicha dilución.

JENKINS y RICKARD (1.984) estudian, mediante E.L.I.S.A., sueros de perros infestados por T.canis, utilizando antígeno E/S. Para el postapizado emplean ovoalbúmina al 1% y para diluir los sueros, P.B.S.-Tween 20-ovoalbúmina, procesándolos a la dilución 1/80. Después de añadir anti-IgG conjugada con ureasa y urea con púrpura de bromocresol como sustrato, leen a 450 nm, considerando positivos D.O. superiores a 0,350.

Para comprobar una posible normalización de la técnica E.L.I.S.A. con antígeno E/S, SPEISER y GOTTSTEIN (1.984) realizan un estudio comparativo preparando los antígenos y realizando las pruebas con las mismas muestras en dos laboratorios diferentes. Obtienen un 80% de concordancia diagnóstica sobre 25 sueros de pacientes sospechosos de infestación por T.canis. La especificidad la determinan en un 93% sobre sueros de pacientes con otras infestaciones helmínticas, observando sólo reacciones cruzadas con sueros de pacientes con filariosis (cinco de 13 casos) que muestran una D.O. muy elevada en su sistema homólogo. La reproducibilidad (variaciones intra e interprueba) de los dos sistemas de E.L.I.S.A. utilizando los correspondientes antígenos varía del 5% al 15%. Con los resultados expuestos, los autores opinan que el antígeno E/S es idóneo para la normalización de la técnica E.L.I.S.A. en el diagnóstico de la toxocarosis humana.

WATZKE y col. (1.984) estudian T.O. en monos infestados por T.canis siguiendo la técnica de CYPESS y col (1.977). Expresan los resultados según el logaritmo en base dos, considerando como positivo cuatro o superior (igual o superior a 1/16), como dudoso tres (1/3), y uno ó dos como negativo.

REE y col (1.984) utilizan E.L.I.S.A. con antígeno E/S de T.canis para investigar anticuerpos en sueros humanos. Consideran D.O. iguales o inferiores a 0,500 como resultado negativo; entre 0,510 y 1,500 como infestación pasada o infestación actual ligera, y, superiores a 1,500 como fuertemente positivo.

GLICKMAN y col. (1.985) investigan la posible utilización de la detección de anticuerpos mediante E.L.I.S.A. en la T.O., utilizando tanto antígeno E/S como extracto de huevos embrionados, a una concentración de 12 ug/ml. Tras absorber los sueros con extracto de huevos de A.suum (50 ul suero más 20 ul de extracto), diluyen a la 1/8, realizan la lectura espectrofotométrica a 405 nm después de incubar la reacción a temperatura ambiente y utilizan como sustrato de la peroxidasa el ácido 5-aminosalicílico.

NICHOLAS y col. (1.984) estudian la producción de anticuerpos en ratones inoculados con huevos embrionados de T. canis frente al antígeno E/S mediante E.L.I.S.A.. Tapizan las placas incubándolas con el antígeno en el medio de cultivo toda la noche a 40C, manteniendo los sueros diluidos en P.B.S. en las mismas condiciones. Como conjugado utilizan anti-IgG de ratón conjugadas con fosfatasa alcalina diluidas a 1/500 con P.B.S., y como sustrato p-nitrofenilfosfato sódico, leyendo finalmente la absorbancia a 405 y 620 nm.

KAYES y col. (1.985) emplean una concentración de antígeno E/S de 20 ug/ml para la realización del E.L.I.S.A. y utilizan como sustrato ácido 2,2'-azino-di-3-etil-benzotiazolín sulfónico 0,4M y peróxido de hidrógeno 2mM. Después de leer a 405 nm, expresan los resultados a la dilución 1/128.

RIERA y col. (1.985), utilizando antígeno somático de larvas de segundo estadio de T.canis, calculan la D.O. de la población normal ($x = 0,300 \pm 0,100$) y establecen dos niveles de positividad: positivo débil (D.O.

entre $x \pm 2\sigma$ y $x \pm 4\sigma$, es decir, D.O. entre 0,500 y 0,700) y positivo fuerte (D.O. superiores a $x \pm 4\sigma$, lo que supone D.O. superiores a 0,700).

HERSKOVIC y ASTORGA (1.985) estudian la presencia de anticuerpos anti-Toxocara mediante el método E.L.I.S.A., utilizando antígeno de T.canis y A.suum, realizando la absorción de los sueros con antígeno de A.suum. Utilizan como sustrato ácido 5-aminosalicílico y consideran el título como la última dilución que produce un cambio evidente de color.

HERRMAN y col. (1.985) utilizan E.L.I.S.A. con antígeno total larvario para medir la concentración de anticuerpos anti-T.canis en sueros humanos. Afirman que esta técnica proporciona un 78% - 90% de sensibilidad y una especificidad superior al 90%. Expresan el título como el logaritmo en base dos, igual o superior a cinco.

EDWARDS y PORDELL (1.985) utilizando la técnica de POLLARD y col. (1.979) consideran positivo en E.L.I.S.A., para T.O., un título de 1/64, en un sistema que, según ellos, presente una especificidad del 90% a títulos superiores a 1/32.

GLICKMAN y col. (1.985, 1.987) afirman que E.L.I.S.A. con antígeno E/S de T.canis es un método válido, sin necesidad de absorber los sueros, para diferenciar casos de retinoblastoma de otros afectados por T.O., prefiriéndolo al extracto de huevos embrionados.

BRUNELLO y col. (1.986) utilizan el E.L.I.S.A. indirecto, descrito por VOLLER y col. (1.976), para detectar IgG específica frente al antígeno E/S de T. canis en sueros humanos. Tapizan las placas con 100 ul del antígeno a 0,7 ug/ml, en tampón carbonato pH 9,6, durante toda la noche a 4°C. Tras lavar las placas cuatro veces con P.B.S.-Tween 20 al 0,05%, añaden 100 ul de los sueros a la dilución 1/1.000 en P.B.S.-Tween. Incuban de nuevo toda la noche a la misma temperatura, lavan y añaden 100 ul de anti-IgG humanas conjugadas con peroxidasa a la dilución 1/1.500 en P.B.S.-Tween, incubando una hora a 37°C. Tras el lavado, añaden 50 ul de o-fenilenodiamina en tampón citrato fosfato pH 5,5, con un 0,15% de peróxido de hidrógeno. Frenan la reacción a los 30 minutos añadiendo 50 ul de ácido sulfúrico 4N y determinan los resultados por lectura espectrofotométrica a 490 nm.

GENCHI y col. (1.986) utilizan también E.L.I.S.A. con exoantígenos de T.canis para detectar anticuerpos anti-IgG en suero y humor vítreo de 12 pacientes con diagnóstico clínico de T.O.. Los valores se expresan en D.O..

GUILLEN y col. (1.986, a) utilizan E.L.I.S.A. con antígeno E/S de T.canis para la detección de anticuerpos específicos en pacientes con sospecha clínica de L.M.V.. Emplean el antígeno a una concentración de 1,5 ug/ml y los sueros a la dilución 1/150. Como criterio de valoración utilizan el Índice Diagnóstico (I.D.) consistente en dividir la D.O. del problema entre la del testigo negativo una vez restada su correspondiente fijación inespecífica a la B.S.A. utilizada en el postapizado, considerando negativos aquellos sueros con I.D. inferior a dos, dudosos entre dos y tres y positivos los superiores a tres. CUELLAR y col. (1.990, a) revisan este criterio diagnóstico, comparando los resultados obtenidos en E.L.I.S.A. expresados como I.D., con los obtenidos mediante microprecipitación larvaria, al investigar anticuerpos específicos en el suero de pacientes con sospecha de L.M.V.. Tras los resultados obtenidos concluyen que el criterio de positividad puede establecerse desde tres en adelante, y los valores hasta ahora considerados como dudosos (2-3) se confirman como negativos. No obstante, opinan que los pacientes con sospecha clínica de L.M.V. y los sueros con valor diagnóstico de tres, ó cercanos a tres, deben ser revisados.

ROMBERT (1.987) realiza un estudio en 45 sueros de pacientes de L.M.V., comparando antígeno de huevos embrionados y total de adulto, mediante la técnica E.L.I.S.A.. Utiliza el antígeno de huevos embrionados a 2 ug/ml y realiza la lectura a 405 nm, considerando como positivos a aquellos sueros con D.O. superiores a 0,400. Indica que tras el estudio comparativo con los dos antígenos, el total de adulto puede servir para este tipo de exámen, ya que es más fácil de obtener, mientras que el de huevos embrionados, a pesar de ser más específico, es más difícil de obtener y puede ser reservado para los casos dudosos.

MIKULIC y VAZIC-BABIC (1.986) utilizan E.L.I.S.A. con antígeno E/S para la detección de anticuerpos específicos anti-Toxocara en pacientes con eosinofilia procedentes del norte de Croacia. Prueban los sueros a una sola dilución, 1/1.000, utilizan anti-IgG humanas marcadas con fosfatsa alcalina como conjugado y determinan los resultados espectrofotométricamente a 450 nm. Para la interpretación de los resultados, mantienen el criterio de DE

SAVIGNY y col. (1.979): los sueros con valores de D.O. en E.L.I.S.A. por encima de 0,500 se consideran positivos, y los de valores inferiores a esta cifra se consideran negativos.

BOWMAN y col. (1.987) utilizan E.L.I.S.A. con antígeno E/S de T. canis a una concentración de 20 ug/ml en tampón carbonato. Postapizan con B.S.A. y añaden los sueros a las diluciones 1/500 para la determinación de IgG y 1/30 para IgM, utilizando como sustrato para la peroxidasa ácido 2,2'-azino-di-3-etil-benzotiazolín sulfónico con peróxido de hidrógeno. Después de leer a 405 nm. determinan el nivel de anticuerpos dividiendo los valores de absorbancia de los sueros problema entre los de los controles.

MARMOR y col. (1.987) estudian el suero de niños entre uno y 15 años buscando anticuerpos anti-Toxocara mediante E.L.I.S.A. según la técnica descrita por CYPESS y col. (1.977) y GLICKMAN y col. (1.978). Consideran como casos positivos aquellos sueros para los que la inversa del título de anticuerpos es mayor o igual a 16 y, como controles, aquellos cuya inversa del título es menor a uno.

RIERA y col. (1.987, a) ponen a punto la técnica E.L.I.S.A. en modelo murino, para su aplicación posterior al diagnóstico humano. Utilizan como antígeno un sonificado de larvas de segundo estadio de T. canis a una concentración de 3 ug/ml, aunque posteriormente (RIERA y PORTUS, 1.988) emplean otro tipo de antígeno (E/S larvario) a una concentración de 1 ug/ml, para el estudio de anticuerpos en sueros humanos. En ambos casos utilizan la dilución 1/100 para los sueros, empleando como sustrato para la peroxidasa ácido 3-dimetil-amino benzoico y 3-metil-2-benzotiazolín hidrazona, realizando la lectura a 600 nm. Como criterio de valoración siguen utilizando el establecido en un trabajo anterior (RIERA y col., 1.985).

GENCHI y col. (1.987) utilizan la técnica E.L.I.S.A. con antígeno E/S de T. canis para la investigación de IgG específica en suero y humor acuoso de pacientes sospechosos de T.O., siguiendo el método descrito por VOLLER y col. (1.976), con ligeras modificaciones. Tapizan incubando toda la noche a 40°C el antígeno diluido a 0,7 ug/ml en tampón carbonato pH 9,6. Tras el lavado, incuban los sueros diluidos en P.B.S.-Tween a 1/1.000 toda la noche a 40°C. Como antisuero emplean anti-IgG humanas conjugadas con peroxidasa, diluidas a 1/1.500 en P.B.S.-Tween y, tras la incubación durante una hora a

37°C, lavan, añaden o-fenilenodiamina en tampón citrato fosfato pH 5,5 con un 0,015% de peróxido de hidrógeno, y frenan la reacción a los 30 minutos con ácido sulfúrico 4 N. Expresan los resultados después de leer espectrofotométricamente a 490 nm.

MORETTI y PIERGILI FIORETTI (1.988) realizan un estudio sobre niños en edad escolar mediante la determinación de anticuerpos IgG e IgE. Para la IgG utilizan la técnica E.L.I.S.A. descrita por PIERGILI y col. (1.978) empleando antígeno E/S a una concentración de 9 ug/ml. Para la determinación de IgE, utilizan la misma técnica pero amplificada mediante la adición de un conjugado adicional marcado (anti-Ig de conejo) después de la incubación con un conjugado sin marcar (IgG de conejo anti-IgE humana), realizando la lectura a 449 nm. Consideran positivos los sueros que a la dilución 1/512 dan una D.O. superior a la media más tres veces la desviación standard.

LYNCH y col. (1.988, b) utilizan E.L.I.S.A. con antígeno E/S para el estudio de toxocarosis en sueros humanos de diferentes grupos socioeconómicos en Venezuela. Emplean el antígeno a 1 ug/ml en tampón carbonato pH 9,6. Realizan las diluciones seriadas de los sueros en P.B.S. con 0,1% de Tween 20, y los incuban en presencia de extractos antigénicos no homólogos (de otros parásitos). Después de añadir anti-IgG humanas conjugadas con fosfatasa alcalina y p-nitrofenilfosfato en tampón de dietilamina como sustrato, frenan con NaOH 2M y miden la D.O. a 405 nm.

EMBIL y col. (1.988) analizan el suero de niños menores de 15 años mediante E.L.I.S.A. con antígeno E/S de T. canis, con el que tapizan las placas a 1 ug/pocillo. Añaden los sueros a la dilución 1/32 en P.B.S. con Tween al 0,05% y B.S.A. al 1%, las anti-IgG humanas conjugadas con peroxidasa a la dilución 1/1.000 y como sustrato utilizan ácido 2,2'-azino-di-3-etil-benzotiazolín sulfónico conteniendo un 0,01% de peróxido de hidrógeno. Leen la D.O. resultante tras 10 minutos de incubación a 405 nm, considerando positivos a aquellos sueros con un título mayor o igual a 1/32.

ROBERTSON y col. (1.988) utilizan el método E.L.I.S.A. para la detección de anticuerpos anti-Toxocara por el método descrito por DE SAVIGNY y col. (1.979). Tapizan las placas con antígeno E/S a 1 ug/ml en tampón carbonato, pH 9,6 durante toda la noche a 4°C; tras el lavado correspondiente

añaden los sueros diluidos en P.B.S.-Tween 20 en diluciones seriadas desde 1/100, incuban una hora a 37°C, y visualizan los anticuerpos ligados con anti-inmunoglobulinas marcadas con peroxidasa, utilizando con cromógeno o-fenilenodiamina o ácido 2,2'-azino-di-3-etil-benzotiazolín sulfónico, leyendo espectrofotométricamente a 492 nm ó 405 nm respectivamente.

El mismo autor utiliza un E.L.I.S.A. de inhibición, para la detección de anticuerpos frente a determinados epítomos del antígeno E/S, basándose en la técnica empleada por CRUISE y col. (1.981). Tapizan las placas con antígeno E/S como se describe anteriormente, postapizando con leche desnatada en polvo al 5% en P.B.S. durante 30 minutos. Tras el lavado, añaden los sueros a la dilución 1/20 en P.B.S.-Tween 20 e incuban dos horas a 37°C. A continuación incuban durante toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa. Calculan el porcentaje de inhibición como la D.O. obtenida con el anticuerpo monoclonal marcado en ausencia de suero, menos la D.O. obtenida por presencia del suero, dividido entre la primera y multiplicado por cien.

HUWER y col. (1.989) utilizan E.L.I.S.A. con antígeno somático de larvas de segundo estadio de T. canis diluido en tampón carbonato 0,1 M a 10 ug/ml. Tras la incubación de 200 ul de la dilución del suero humano, añaden conjugado de conejo anti-inmunoglobulinas humanas marcado con peroxidasa a la dilución 1/1.000, utilizando como sustrato específico tolidina en dimetilformamida disuelta en tampón aceto/acetato pH 3,7 al que añaden peróxido de hidrógeno. Tras la incubación a temperatura ambiente, frenan a los 15 minutos, leyendo la reacción espectrofotométricamente.

INOUE y TSUJI (1.988) emplean un E.L.I.S.A. con tres tipos de antígeno de T. canis (extracto de adultos, extracto larvario y extracto de huevos embrionados) para el diagnóstico de la L.M.V.. Como concentración standard de antígeno utilizan 20 ug/ml, como conjugado anti-IgG humanas marcadas con peroxidasa y como sustrato o-fenilenodiamina al 0,01% con un 0,003% y 0,05% de peróxido de hidrógeno respectivamente, para sueros a la dilución 1/100 y para sueros a la dilución 1/1.000.

LJUNGSTROM y VAN KNAPEN (1.989) miden anticuerpos anti-Toxocara en E.L.I.S.A. por el método descrito por VAN KNAPEN y col. (1.983) utilizando antígeno E/S. Añaden los sueros a la dilución 1/100 utilizando como

conjugado anti-inmunoglobulinas humanas marcadas con peroxidasa y como sustrato ácido 5-aminosalicílico en peróxido de hidrógeno, considerando como límite de positividad una D.O. de 0,300 que corresponde a la D.O. media del suero negativo +/- tres veces la desviación estándar.

UGA y col. (1.990) investigan anticuerpos anti-Toxocara en E.L.I.S.A., tapizando con antígeno E/S a 5 ug/ml. Utilizan los sueros a la dilución 1/100, como conjugado anti-IgG humanas marcadas con peroxidasa a la dilución 1/1.000, midiendo el resultado de la actividad enzimática utilizando como sustrato ácido 2,2'-azino-di-3-etil-benzotiazolín sulfónico. Leen la absorbancia a 410 nm y expresan los resultados como el cociente entre la D.O. a 410 nm del suero problema y la media de la D.O. a 410 nm del suero control negativo (T/N). Consideran como fuertemente positivos (++) los valores de T/N mayores o iguales a 11,4; como positivos (+) los valores superiores o iguales a 3,3; como dudosos (+/-) los comprendidos entre 3,3 y 1,8 y como negativos (-) los inferiores a 1,8.

MATSUMURA y col. (1.987) describen la utilidad del E.L.I.S.A. "dot" en la toxocarosis canina. Añaden 100 ul de antígeno E/S a 100 ug/ml, bloquean con 50 ml de B.S.A. al 2% en P.B.S. y diluyen los sueros (50 ul) a la 1/160. Tras añadir anti-IgG conjugadas con peroxidasa y 4-cloro-1-naftol con peróxido de hidrógeno como sustrato, observan la reacción coloreada eliminando el sustrato por reducción de la presión. Consideran reacción positiva el desarrollo de puntos azules bien definidos en observación visual, realizando la medida cuantitativa en un densitómetro.

CONDE-GARCIA y col. (1.989) analizan sueros en busca de anticuerpos anti-Toxocara mediante la técnica E.L.I.S.A. "dot" descrita por PAPPAS y col. (1.983), quienes tras fijar 1 ul de antígeno a discos de nitrocelulosa estabilizándolo por secado durante 10 minutos a 56 °C, utilizan como agente bloqueante T.B.S. en B.S.A. al 5%. A continuación añaden diluciones seriadas de los sueros en T.B.S.-B.S.A. al 1%. Tras los lavados correspondientes con Nonidet-P40 al 0,05% en T.B.S. utilizan anti-IgG humanas conjugadas con peroxidasa a la dilución 1/100 en T.B.S.-B.S.A. al 1% (pH 7,4). Como sustrato emplean 4-cloro-1-naftol disuelto en metanol anhidro a 3 mg/ml, al que se añaden inmediatamente antes de su uso, 10 ml de T.B.S. y 4 ul de peróxido de hidrógeno al 30% por cada 2 ml de 4-cloronaftol. Consideran

positivos aquellos sueros que provocan el desarrollo de puntos azules bien definidos en los discos con antígeno.

Las modificaciones introducidas por CONDE-GARCIA y col. (1.989) son: la utilización de un aparato Bio-Dot (Bio Rad) con membrana de nitrocelulosa; el tampón es P.B.S. a pH 7,2; como solución de lavado utilizan P.B.S.-Tween 20 al 0,5%; como conjugado anti-IgG conjugadas con peroxidasa a la dilución 1/200; y frenan la reacción lavando las membranas con agua destilada y dejándolas secar a continuación. Emplean antígeno E/S de T. canis a 1 ug/ml y utilizan los sueros desde la dilución 1/40 a 1/1.280, considerando como positivos los que se tiñen a la dilución 1/120.

Entre las técnicas inmunológicas utilizadas para el diagnóstico de la toxocarosis, hay que citar también la técnica de radioinmunoanálisis (R.I.A.), que emplea antisueros marcados con isótopos radiactivos.

SMITH y col. (1.980) intentan la detección de anticuerpos frente a T. canis en sueros humanos mediante la prueba del radioinmunsorbente en papel (P.R.I.S.T.). Utilizan antígeno E/S sobre 15 discos de papel Whatman activados con bromuro de cianógeno, añadiendo el antígeno a concentraciones de 10, 100 y 500 ug. Para el revelado emplean anti-IgG humanas marcadas con ¹²⁵I y expresan los resultados en c.p.m..

DESOWITZ y col. (1.981) determina IgE específica frente a T. canis en pacientes asmáticos, mediante la prueba del radioalergosorbente (R.A.S.T.) en fase sólida, utilizando una concentración de antígeno de 10 mg. Consideran positivo un porcentaje de actividad igual o superior al 5%.

GENCHI y col. (1.983, b) estudian la presencia de IgE anti T. canis en sueros de pacientes sintomáticos y donantes de sangre sanos. Utilizan R.A.S.T. con material comercializado y antígeno de larvas de T. canis. Expresan los niveles específicos de IgE en porcentajes de radioactividad, según un sistema de referencia (clase 0 = - ; clases 1, 2, 3 y 4 = + con niveles de incremento). Los mismos autores (1.987) emplean esta técnica, descrita por WIDE y col. (1.967), con algunas modificaciones, para la detección de IgE. Incuban partículas de poliestireno recubiertas con antígeno E/S en un agitador horizontal durante tres horas y media, con 50 ul de suero. Tras el lavado con solución salina conteniendo Tween 20 al 0,4%, añaden

50 ul de anti-IgE (fracción específica Fc) marcada con ^{125}I e incuban las partículas de nuevo toda la noche en el agitador horizontal. Tras lavar convenientemente, miden la radioactividad en un contador gamma, calculando el porcentaje de radioactividad ligada.

NICHOLAS y col. (1.984) evalúan mediante R.I.A. la producción de anticuerpos específicos en ratones infestados con 1.000 huevos embrionados de T. canis. Siguen el método descrito por MITCHELL y col. (1.979), tapizando las placas con 15 ug/pocillo para antígeno somático larvario y 6 ug/pocillo para antígeno E/S larvario. Trabajan con una dilución del suero de 1/10 y con anti-IgG de ratón purificadas por afinidad y marcadas con ^{125}I según el método de la cloramina T de GREENWOOD y col. (1.963).

Otros autores como TRIBOULEY-DOURET y col. (1.976) utilizan extractos antigénicos delipidados de adultos de T. canis para la detección de anticuerpos en conejos y ratones mediante fijación del complemento.

RUITENBERG y BUYS (1.976) también emplean la fijación del complemento, usando material cuticular de adultos de T. canis como antígeno.

La misma técnica es utilizada por KOIZUMI y col. (1.983) realizándola mediante la determinación de la concentración hemolítica 50.

2.12.1.1.2.- Detección de inmunocomplejos circulantes

AGUILA y col. (1.987) desarrollan un E.L.I.S.A. "sandwich" para investigar la presencia de inmunocomplejos específicos en sueros de pacientes de L.M.V. previamente determinados mediante E.L.I.S.A. con antígeno E/S de T. canis. Para el E.L.I.S.A. "sandwich" utilizan el anticuerpo monoclonal TC-1 (AGUILA y col. 1.988) a una concentración de tapizado de 5 ug/ml. Diluyen los sueros a la 1/25 y 1/50, empleando como sustrato o-fenilenodiamina con peróxido de hidrógeno. Utilizan el criterio de valoración de GUILLEN y col. (1.986, a). Este método ha sido utilizado posteriormente por CUELLAR y col. (1.990, b) para determinar inmunocomplejos específicos en conejos experimentalmente infestados antes y después del tratamiento con mebendazol.

2.12.1.1.3.- Detección de antígenos circulantes

MATSUMURA y col. (1.984) utilizan un E.L.I.S.A. "sandwich" para detectar antígenos circulantes en perros infestados por T.canis, utilizando los sueros a la dilución 1/5 y absorbiendo previamente con extracto de A. lumbricoides, F. hepática y Dirofilaria immitis.

BOWMAN y col. (1.987) investigan los niveles de antígenos circulantes en ratones mediante E.L.I.S.A., con la ayuda de un suero policlonal de conejo anti-T. canis. Revelan el sistema mediante el mismo suero marcado con biotina y utilizan una curva patrón para evaluar los niveles de antígeno detectado.

ROBERTSON y col. (1.988) utilizan un E.L.I.S.A. o un R.I.A. "sandwich" con un anticuerpo monoclonal Tcn-2 (IgM), (MAIZELS y col. 1.987), para la detección de antígeno E/S circulante en sueros murinos, de conejo, de perros y humanos. Incuban las placas toda la noche a temperatura ambiente con 50 ul del anticuerpo monoclonal purificado a 5 ug/ml o con las ascitis diluidas a 10 ug/ml en tampón carbonato 0,06 M, pH 9,6. Por otro lado, y en placas aparte, incuban 25 ul de las muestras de suero diluidas a 1/10 en P.B.S.-Tween 20 al 0,05%, con 25 ul del anticuerpo monoclonal marcado con iodo radioactivo (6×10^4 c.p.m./pocillo) (R.I.A.) o con peroxidasa (E.L.I.S.A.) diluido a 1/500, durante dos horas a 37°C. A continuación lo transfieren a la placa previamente tapizada con el anticuerpo monoclonal e incuban toda la noche a temperatura ambiente. Tras lavar convenientemente las placas con P.B.S.-Tween 20, revelan el sistema mediante lectura con un contador gamma (R.I.A.) o con o-fenilenodiamina o ácido 2,2'-azino-di-3-etil-benzotiazolín sulfónico, leyendo espectrofotométricamente a 490 y 405 nm respectivamente (E.L.I.S.A.).

Para detectar el antígeno sérico complejoado por las inmunoglobulinas, ROBERTSON y col. (1.988) disocian los inmunocomplejos mediante tratamiento con EDTA, según WEIL y col. (1.985). Mezclan las muestras de suero con un volumen igual de EDTA 0,2 M a pH 8, hierven durante cinco minutos, centrifugan a 14.000 xg durante cinco minutos y emplean el sobrenadante resultante en E.L.I.S.A. "sandwich" para la detección del antígeno, utilizando el anticuerpo monoclonal Tcn-2 del modo descrito anteriormente.

2.12.1.2.- TECNICAS QUE DETECTAN LA INMUNIDAD CELULAR.

WONG y col. (1.976) inoculan cobayas con antígeno de A.suum y T.canis, y cuatro semanas después realizan un test de **inhibición de la migración de macrófagos**. Inoculan 30 ml de aceite mineral por vía I.P. y tres días después extraen el exudado peritoneal tras la inyección de H.B.S.S. heparinizado. Después de lavar, incuban las células en Medio 199 con 240, 160, u 80 ug/ml de antígeno de Toxocara y Ascaris durante 24 horas a 37°C. Después de medir el área de migración con un planímetro, calculan el porcentaje de inhibición.

Asimismo, estudian la transformación de linfocitos mediante la incorporación de timidina tritiada, a una concentración final de 1 uCi/ml y, después del recuento en contador de centelleo, convierten los datos en índice de estimulación.

KAYES y OAKS (1.980) realizan el test de inhibición de la migración de macrófagos de bazos de ratones inoculados con T.canis; incuban las células en Medio RPMI-1640 con 12,5 ug/ml de antígeno de T.canis y calculan el índice de migración. La misma técnica es utilizada posteriormente por SUGANE y OSHIMA (1.982) con una concentración de 20 ug/ml de antígeno procedente de huevos embrionados de T.canis.

Otros autores como WELCH y col. (1.979) ensayan la técnica de **transformación de linfocitos**. LLOYD y col. (1.983) examinan perros inoculados mediante esta técnica, estimulando los cultivos con 40 ug de antígeno total de T.canis adulto, pulsan con timidina tritiada y calculan el índice de estimulación.

También GLICKMAN y col. (1.984) estudian la estimulación blástica de linfocitos, en un intento de mejora del diagnóstico de la L.M.V., en monos inoculados con huevos embrionados de T.canis. Para ello utilizan antígeno somático de T.canis a una concentración de 1-20 ug/ml.

KAYES y col. (1.985) estudian la respuesta inmune en ratones inoculados con T.canis mediante transformación de linfocitos. Preparan una suspensión de esplenocitos y determinan la incorporación de timidina tritiada

tras la estimulación con antígeno (1 ug de extracto de huevos embrionados/ml).

BADLEY (1.985) estudia la inmunidad celular mediante la adherencia de eosinófilos a larvas infestantes de T.canis. Usando células de exudado peritoneal de cobayas infestados, observa la máxima adherencia con suero inmune y complemento presentes. La absorción del suero con exoantígenos anula toda la adherencia y la fijación del complemento.

FATTAH y col. (1.986) investigan si las larvas infestantes de T. canis podrían ser destruidas en presencia de suero con elevado título de anticuerpos anti-Toxocara y eosinófilos humanos. Observan que a los 10 minutos de exposición, los eosinófilos se adhieren a la superficie de la larva, y a los 40 minutos las células se aplastan sobre la cutícula y se degranulan. Sin embargo, detectan que a las tres horas, los eosinófilos comienzan a desprenderse, y las larvas permanecen vivas al menos durante una semana.

CASAROSA y col. (1.982) estudian la reacción de adherencia por opsonización, entre larvas de segundo estadio de T. canis, sensibilizadas con suero de conejos infestados con huevos embrionados (recolectado al tercero, quinto, séptimo y decimoquinto día p.i.), y macrófagos peritoneales de cobayas. Observan que el test es positivo a partir de una dilución del suero de 1/25, comenzando a partir del séptimo día p.i.

KAYES y col. (1.988) comprueban que extractos de huevos embrionados y exoantígenos de T. canis acoplados a partículas de Sepharosa 4B, son capaces de provocar granulomas antígeno-específicos similares a los formados normalmente alrededor de las larvas de segundo estadio, cuando se embolizan en la microvasculatura pulmonar de ratones CBA/J, que habían sido previamente infestados 10 días antes con 25 huevos embrionados. Esta reactividad granulomatosa puede ser transferida a ratones singénicos, usando células obtenidas de lavado broncoalveolar, pero no utilizando esplenocitos o suero inmune. Este modelo permitiría el estudio detallado de la mediación química e inmunoregulación de las lesiones de hipersensibilidad retardada mediada por células.

2.12.2.- RESPUESTA INMUNITARIA EN ANIMALES DE LABORATORIO

2.12.2.1.- RESPUESTA HUMORAL

2.12.2.1.1.- Respuesta humoral en ratones

BAUFINÉ-DUCROCO y col. (1.974), mediante I.F.I. con secciones de huevos embrionados de T.canis, obtienen un título de 1/10 en sueros de ratones inoculados el día siete p.i.; de 1/40-1/80 el día 15 p.i.; y los más elevados (1/160-1/320) el día 30 p.i..

TRIBOULEY-DURET y col. (1.976) infestan ratones con 3.000 huevos de T. canis y estudian la respuesta de anticuerpos precipitantes mediante inmunodifusión de OUCHTERLONY (1.953). Observan reacción positiva desde la primera semana empleando como reactivo antigénico un extracto delipidado de vermes adultos.

DAFALLA (1.978) inocula ratones con huevos embrionados de T.canis y estudia la dinámica de la respuesta inmune mediante P.C.A.. En las dos primeras semanas p.i. no encuentra anticuerpos detectables; el máximo lo obtiene entre la segunda y la tercera semana y durante la cuarta y la quinta sólo obtiene una débil respuesta.

PRZYJALKOWSKY y col. (1.978) inoculan 24 ratones C3H con 3.000 huevos embrionados de T.canis y estudian la producción de anticuerpos mediante precipitación, floculación con látex y difusión en agar. Obtienen resultados negativos los días seis y ocho p.i. y detectan anticuerpos a la dilución 1/32 el día 12 p.i..

HAMMOUDA y col. (1.982) inoculan ratones con 100 huevos embrionados de T.canis y observan mediante I.F.I. un pico máximo de anticuerpos aproximadamente 20 días después de la inoculación.

SUGANE y OSHIMA (1.983), en ratones BALB/c inoculados con 500 huevos embrionados de T.canis, comienzan a detectar anticuerpos a la segunda semana p.i., que alcanzan su máximo a la décima semana y empiezan a decrecer

doce semanas después de la inoculación, mediante técnicas de aglutinación en látex.

NICHOLAS y col. (1.984) estudian, en sueros de ratones CBA y BALB/c inoculados V.O. con 1.000 huevos embrionados, la presencia de anticuerpos frente a antígenos somáticos y E/S de larvas de T.canis, después de un periodo de 10 semanas, mediante R.I.A.. A la dilución 1/10 detectan anticuerpos frente a ambos antígenos a las 2-3 semanas p.i., que aumentan hasta las 6-7 semanas, para luego caer suavemente hasta la décima semana. Cuando utilizan E.L.I.S.A. con antígeno E/S, el suero a la dilución 1/100 produce una señal claramente positiva a las cuatro semanas de la inoculación.

KAYES y col. (1.985) inoculan ratones CBA/J con 5, 25, 125 y 250 huevos embrionados de T.canis; sangran los días 14, 21 y 28 p.i. y determinan IgG e IgM por E.L.I.S.A. a la dilución 1/128. En los lotes inoculados con cinco huevos, no encuentran respuesta a los 14 ni a los 21 días, y sólo, ligeramente, a los 28. Cuando inoculan 25 huevos, obtienen una pequeña señal el día 14, que aumenta ligeramente el 21 y se duplica el 28. Con 125 huevos, observan una respuesta humoral alta que no varía apreciablemente con el tiempo; y lo mismo con 250 huevos, aunque algo más elevada. Concluyen afirmando que el número de huevos utilizado es un criterio importante para determinar la calidad y cantidad de la respuesta inmune en hospedadores paraténicos frente al parásito, puesto que solamente los ratones con 125 ó 250 huevos reaccionan positivamente.

BOWMAN y col. (1.987) inoculan ratones BALB/c con 500 huevos infestantes de T. canis y estudian los niveles de anticuerpos específicos mediante E.L.I.S.A. con antígeno E/S, encontrando un pico máximo a las seis semanas de la inoculación, con valores aproximadamente seis veces superiores a los del suero negativo en el caso de la IgM y quince veces en el de la IgG.

CUELLAR y col. (1.990, c) inoculan ratones BALB/c y C57BL/10 con 1.000 huevos embrionados de T.canis en pauta simple y con 1.000 huevos embrionados semanales en pauta múltiple durante cuatro semanas.

Al inocular ratones BALB/c en pauta simple observan que los niveles de anticuerpos, frente al antígeno E/S, comienzan a hacerse patentes a la

segunda semana p.i. y van aumentando progresivamente hasta alcanzar un máximo la novena semana p.i., manteniéndose positivos hasta la semana decimoprimer (fin de la experiencia) con una disminución gradual. Con la misma pauta simple en la cepa C57BL/10, y frente al antígeno E/S, comienzan a detectar anticuerpos la segunda semana p.i., que aumentan progresivamente hasta alcanzar un máximo la séptima semana, observando una meseta durante las semanas quinta, sexta, séptima y octava.

Al utilizar pauta de inoculación múltiple en ratones BALB/c frente al antígeno E/S, observan un rápido aumento en los niveles de anticuerpos la segunda semana p.i. que se elevan en la quinta semana, con una meseta durante las semanas quinta a novena, dándose el máximo las semanas sexta y octava. Con la cepa C57BL/10 encuentran que el aumento de los niveles de anticuerpos frente al antígeno E/S no es tan rápido como en la cepa BALB/c, sino que se produce de manera progresiva, con una meseta de duración más prolongada entre la semana quinta y el final de la experiencia, donde el máximo aparece a la séptima semana.

ROBERTSON y col. (1.988) infestan ratones BALB/c o CBA/Ca intraperitonealmente con 1.000 larvas infestantes de T. canis, sangrando diariamente. Detectan anticuerpos, en E.L.I.S.A. con antígeno E/S de Toxocara, desde el día ocho p.i., que alcanzan una meseta hacia el día 12 p.i.. Cuando investigan la presencia de antígeno circulante mediante un E.L.I.S.A. "sandwich" con un anticuerpo monoclonal, lo detectan sólo hasta el día siete p.i., y a partir de este momento, resulta indetectable, bien por secuestro con inmunoglobulinas específicas, bien por aclaramiento de los mismos, o ambos. Cuando someten el antígeno secuestrado a tratamiento con EDTA y calor, antes del ensayo, los sueros resultan positivos hasta el día 14 p.i.. La estabilidad al calor del antígeno circulante excluye la reacción cruzada por captura de anti-idiotipos o factor reumatoide, que pudieran contribuir a la señal positiva.

También investigan la especificidad de especie, probando sueros de ratones infestados con T. canis y con T. cati. Observan que los ratones infestados por T. canis tienen niveles elevados de anticuerpos que reconocen epítomos propios del anticuerpo monoclonal TC-2 (medidos por test de inhibición en E.L.I.S.A., usando dicho anticuerpo monoclonal marcado), mientras que los infestados por T. cati muestran niveles insignificantes de estos

anticuerpos, aunque sí tienen niveles elevados de anticuerpos que precipitan con todos los componentes del antígeno E/S de T. canis (MAIZELS y col. 1.987; KENNEDY y col. 1.987), en virtud del resto de los determinantes compartidos por ambas especies.

2.12.2.1.2.- Respuesta humoral en otros modelos animales

KOIZUMI y col. (1.983), mediante inmunodifusión radial reversa, investigan los títulos de anticuerpos frente al antígeno E/S larvario, en ratas inoculadas con 50, 500, y 5.000 huevos de T. canis durante seis semanas p.i.. En ratas inoculadas con 50 huevos comienzan a detectar anticuerpos a las dos semanas (dilución 1/15) que aumentan a las cuatro semanas (1/20) permaneciendo invariables a la sexta semana p.i.. Con 500 huevos, obtienen títulos de 1/20 a la segunda semana, que aumentan durante la tercera (1/75), para alcanzar el máximo a la cuarta (1/100) y disminuir levemente seis semanas después de la inoculación. Finalmente, con un inóculo de 5.000 huevos, observan un aumento gradual de la respuesta a lo largo de las semanas dos (1/40), tres (1/60) y cuatro (1/100) p.i., que no disminuye, sino que permanece elevada (1/115) a las ocho semanas de la inoculación.

Estos mismos autores, estudian la respuesta inmunitaria frente a T. canis en ratas Wistar mediante fijación del complemento, en sueros extraídos a las seis semanas p.i., obteniendo títulos mucho mayores frente a antígenos larvarios (total y E/S) que frente a antígenos de adultos (total y E/S). Mediante inmunodifusión de OUCHTERLONY (1.953), utilizando los mismos sueros, obtienen cuatro líneas de precipitación (una de ellas más intensa) frente a antígeno E/S larvario, una con extracto de larvas y adultos y ninguna con antígeno E/S de adultos. Por ello, piensan que el antígeno E/S larvario y los extractos de larvas y adultos presentan, al menos, un componente antigénico común.

TRIBOULEY-DURET y col. (1.976) inoculan conejos con 1.000, 2.000, 5.000 y 10.000 huevos embrionados de T. canis, sangrándolos a las 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16 y 25 semanas p.i., e investigan la presencia de anticuerpos séricos frente a extractos de adultos. En el lote inoculado con 1.000 huevos obtienen reacciones negativas en todos los casos con precipitación, fijación de complemento y hemaglutinación. Con 2.000 huevos sólo obtienen

reacciones positivas a partir de la semana seis (1/2), que aumenta a la ocho (1/17) y a la 16 (1/22), y caen en la 25 (1/17). En los lotes inoculados con 5.000 huevos comienzan a detectar anticuerpos por fijación del complemento, desde la segunda semana (1/30), que aumentan durante la cuarta (1/6), sexta (1/17) y octava (1/32) y luego caen en la 16 y 25 (1/11 y 1/154, respectivamente). Con 10.000 huevos, comienzan a observar fijación del complemento positiva en la segunda semana (1/3), que aumenta en la tercera (1/6) y disminuye en la cuarta (1/4), para volver a subir a la sexta (1/41) y la octava (1/54). Con H.A.I. obtienen títulos superiores desde la cuarta semana (1/160, 1/640 y 1/1.280 con 2.000, 5.000 y 10.000 huevos respectivamente). Con 2.000 y 5.000 huevos inoculados obtienen dos arcos de precipitación a las ocho y seis semanas p.i. y tres arcos con 10.000 desde la cuarta semana. Para todas las experiencias utilizan como antígeno un extracto de adultos.

SMITH y col. (1.982) estudian la dinámica de la respuesta serológica en conejos inoculados con T.canis. Mediante I.F.I. con secciones de huevos embrionados, observan anticuerpos detectables siete días después de inocular 5.000 huevos. Los títulos aumentan los días 14 (1/80), 21 y 28 (1/60) para luego caer el día 35 (1/80). Mediante E.L.I.S.A., con antígeno E/S de T.canis, detectan anticuerpos circulantes a la dilución 1/800, el día siete, que aumentan rápidamente hasta un máximo de 1/6.400 el día 21 y permanecen constantes con un título de 1/3.200. Utilizando extracto de huevos embrionados, observan un nivel más bajo de anticuerpos en el comienzo de la infestación (1/200 - 1/800), que aumenta el día 35 hasta 1/6.400, para permanecer elevado hasta el final de la experiencia.

KONDO y col. (1.984) utilizan I.F.I. con antígeno de secciones de huevos embrionados de T.canis y E.L.I.S.A. con antígeno E/S, para estudiar IgG e IgM en suero de conejos infestados. Observan un rápido incremento de los títulos a las dos semanas p.i., observando el máximo de IgM a la quinta semana para luego disminuir gradualmente hasta la semana 26.

ROBERTSON y col. (1.988) estudian la cinética de producción de antígenos y anticuerpos en conejos infestados por T.canis, mediante un E.L.I.S.A. "sandwich" con un anticuerpo monoclonal y mediante E.L.I.S.A. con antígeno E/S respectivamente. Observan que los niveles de antígeno son más altos en la primera semana p.i. y sólo detectables transitoriamente

después, bien por aclaramiento, bien por secuestro del sistema inmunitario. Observan que esta caída en los niveles de antígeno circulante se ve acompañada por la aparición de anticuerpos desde la segunda semana p.i., alcanzando una meseta hacia el día 28.

También investigan la presencia de inmunoglobulinas del hospedador, dirigidas específicamente frente a epítomos definidos por dos anticuerpos monoclonales, determinando su capacidad para bloquear la unión de los monoclonales marcados cuando actúan como ligandos. Encuentran que, en conejos, los anticuerpos dirigidos frente al epítomo reconocido por el anticuerpo monoclonal Tcn-3 (IgG) se producen desde la cuarta semana p.i. y permanecen a niveles altos durante toda la experiencia, mientras que los anticuerpos dirigidos frente a los epítomos propios del Tcn-2 (IgM) se sintetizan antes, hacia el día 14, luego caen desde el día 42, y los niveles resultan indetectables después del día 70, ilustrando así las diferencias en la cinética de anticuerpos específicos individuales que contribuyen, sin embargo, a una respuesta policlonal aparentemente uniforme.

CUELLAR y col. (1.990, b) estudian la dinámica de producción de anticuerpos e inmunocomplejos en conejos inoculados con pauta simple (2.000 huevos embrionados/conejo) y múltiple (2.000 huevos embrionados/conejo durante cuatro semanas), mediante E.L.I.S.A. frente al antígeno E/S de T.canis. Con pauta simple comienzan a detectar anticuerpos a la cuarta semana p.i. alcanzando un máximo a las 10 semanas p.i. y permaneciendo en niveles elevados al final de la experiencia. Con pauta múltiple detectan anticuerpos a la segunda semana p.i., aumentando rápidamente y manteniéndose en niveles elevados durante todo el trabajo.

Respecto a la investigación de inmunocomplejos mediante el anticuerpo monoclonal TC-1, en conejos inoculados con una sola dosis, no los detectan durante toda la experiencia; sin embargo, con pauta múltiple, observan niveles elevados a la segunda semana p.i., que disminuyen para volver a aumentar a la sexta semana, detectando niveles elevados durante las tres semanas siguientes, los cuales luego disminuyen, para aumentar de nuevo, durante las semanas 14 y 15 p.i., disminuyendo en la 16, final de la experiencia. Cuando comparan estos resultados con los obtenidos en la detección de anticuerpos, observan que las dos curvas se complementan entre sí y que las disminuciones sucesivas en los niveles de anticuerpos circulantes se

corresponden con el aumento en la tasa de inmunocomplejos, indicando que dichas disminuciones serían la consecuencia del acomplejamiento de los anticuerpos por la presencia en ese momento de cantidades elevadas de sustancias de excreción-secreción.

ENAYAT y PEZESHKI (1.977) estudian mediante H.A.I. y C.I.E. la respuesta humoral de cobayas infestados con 500, 1.000 y 1.500 huevos embrionados de T. canis, utilizando dos extractos antigénicos de helmintos adultos. Con H.A.I., observan títulos, desde 1/20 a 1/40 en todos los cobayas después de la primera semana p.i., que aumentan hasta 1/2.560 en cuatro semanas, para caer hasta 1/1.280 y 1/640. En C.I.E., obtienen títulos más bajos, no detectándose anticuerpos a la primera semana. A las dos semanas de la inoculación, obtienen un título de 1/16 en los inoculados con 1.500 y 1/8 en los otros lotes, con un aumento de los títulos hasta 1/128 (inóculo de 1.500 huevos) en la tercera semana, que se mantiene durante otras dos. Con inóculo de 1.000 huevos, los títulos aumentan hasta 1/64 y 1/128, para disminuir a 1/64 a las cinco semanas p.i.. Finalmente obtienen títulos muy bajos con 500 huevos, que sólo alcanzan 1/32 a las cinco semanas de la inoculación.

GLICKMAN y SOMMERS (1.983) estudian la respuesta inmune humoral en macacos inoculados con 45.000 huevos embrionados de T. canis, mediante E.L.I.S.A. con extracto de huevos embrionados. Detectan anticuerpos por primera vez, el día cuatro después de la inoculación con dosis simple, que alcanzan el nivel diagnóstico (1/32) el día siete, el cual persiste hasta el final de la experiencia (día 220). En los casos de inoculación múltiple, detectan la aparición de anticuerpos entre los días cuatro y siete (1/32) que permanecen hasta el final de la experiencia, más elevados que tras la inoculación simple.

2.12.2.2.- RESPUESTA CELULAR EN RATONES

Del estudio en modelo murino principalmente, se deduce que la infestación por T. canis supone un complejo mecanismo de relación parásito-hospedador, que sugiere la existencia de fenómenos de inmunidad celular y humoral relacionados entre sí.

La respuesta celular frente a T.canis como en la mayoría de las helmintosis, es preferentemente eosinofílica.

BISSERU (1.969) investiga eosinófilos, linfocitos y neutrófilos en sangre de ratones y monos inoculados con huevos infestantes de T.canis, observándose un ascenso más o menos rápido a los pocos días de la infestación. Al reinfestar monos con huevos de T.canis, observa que tanto los linfocitos como los neutrófilos se elevan de nuevo. Según el mencionado autor, esto indica que en el ratón y en el mono, hay esencialmente una respuesta eosinofílica junto con alguna linfocitosis y aumento de los neutrófilos en sangre, en la primera infestación. Observa que el infiltrado linfocitario es el tejido predominante en los ratones, tras la invasión de las larvas de Toxocara. En resumen, concluyen que en ratones y primates, los linfocitos y eosinófilos toman parte en la producción de anticuerpos y ayudan al desarrollo de la resistencia a la invasión de larvas de T.canis.

KONDO y col. (1.975) inoculan ratones con 300 y 600 huevos embrionados de T.canis, observando que el número de leucocitos aumenta rápidamente hasta 21.000 y 32.500/mm³, respectivamente, a las dos semanas p.i., representando los eosinófilos el 10,6% y 15,6% respectivamente, permaneciendo elevados durante nueve semanas p.i.. Al administrar a un tercer grupo 10 dosis de 50 huevos con intervalos semanales, observan una elevada leucocitosis que no disminuye hasta las 19 semanas (fin del estudio), con eosinofilia también persistente. En este grupo observan un aumento de neutrófilos segmentados durante las inoculaciones, mientras que los linfocitos siguen un curso recíproco.

ZAPART y PRZYJALKOWSKI (1.976), en un estudio hematológico para la detección de leucocitos, mediante test de Schilling, tras tinción con May-Grunwald-Giemsa, observan que en ratones machos de la cepa C3H, infestados con 2.000 huevos de T.canis, el mayor incremento en el porcentaje de eosinófilos aparece el sexto día p.i., siendo del 2,5% frente al 0% de los controles. Las variaciones en el número de neutrófilos, linfocitos y monocitos no son estadísticamente significativas. Los mismos autores (PRZYJALKOWSKI y col. 1.978), en un estudio del mismo tipo y con la misma cepa de ratones, pero con un inóculo de 3.000 huevos/ratón, observan una pronunciada eosinofilia el día 12 p.i., que alcanza el 24% este día y el

4,4% el día ocho p.i., mientras que los ratones control no presentan apenas eosinófilos (0,17%). El mayor número de monocitos se observa el día ocho p.i. (9,5%), mientras que el día 12 p.i. obtienen una media de monocitos de sólo el 1,3%.

KAYES y OAKS (1.978) siguen, al microscopio electrónico, la evolución celular del granuloma muscular, en ratón infestado por T.canis, durante 11 semanas. Obtienen un granuloma inicial consistente primariamente en eosinófilos con aparición de infiltrado inflamatorio. A las 48 horas observan que, muchos de los eosinófilos parecen haber perdido sus gránulos y se desintegran, siendo eliminados los restos celulares por macrófagos, aproximadamente a los 28 días de la infestación. Once semanas después de la inoculación, observan que el granuloma se vuelve fibrótico, rodeando totalmente a la larva.

KAYES (1.978) indica que en ratones infestados con T.canis, los linfocitos T deben estar sensibilizados por la gran cantidad de eosinófilos existentes en sangre periférica y por la participación de los mismos en la respuesta inflamatoria a la migración de la larva. Observa que en ausencia de linfocitos T, la formación del granuloma en ratón infestado por T.canis, no ocurre. Encuentran que los linfocitos T durante la infestación, responden a preparados de antígeno larvario en pruebas de inhibición a la migración, y por otra parte, la deplección de linfocitos T, utilizando sueros antilinfocitarios, da lugar a una disminución de la respuesta eosinofílica.

KAYES y OAKS (1.980) estudian en ratón la respuesta celular contra T.canis, determinando que los granulomas formados en hospedadores no definitivos, como ratón y hombre, son ricos en eosinófilos, fijando el pico de eosinófilos en ratón a las dos semanas p.i..

SUGANE y OSHIMA (1.980) determinan la presencia de eosinófilos en ratones infestados, con un pico máximo a los 12 días p.i.. Si en este momento los inocula con extracto de adultos de T.canis, obtienen un exudado peritoneal que presenta un 70-80% de eosinófilos (recuperando un total por ratón de aproximadamente 1×10^8 eosinófilos).

HAMMOUDA y col. (1.982) inoculan ratones con 1.000 huevos de T.canis, observando la aparición, durante los 10 primeros días, de un infiltrado

celular (fundamentalmente neutrófilos) que gradualmente son sustituidos por linfocitos y eosinófilos. Finalmente, y al cabo de dos meses, observan un granuloma bien formado en el hígado.

PROKOPIC y FIGALLOVA (1.982, b), infestando ratones blancos con larvas de T.cati (2.500 huevos/ratón) observan que el séptimo día p.i. el número de leucocitos eosinófilos comienza a subir, alcanzando el máximo (28%) el día 21 p.i.. Después de 45 días, los ratones se infestan de nuevo con 2.000 huevos de A.suum, observando que el número de eosinófilos aumenta alcanzando el máximo (26%) a los día 14 días de la inoculación. El incremento de la eosinofilia lo observan hasta el día 204 después de la primera infestación, o hasta el 159 después de la nueva infestación. Encuentran una relación indirecta entre el número de eosinófilos y los niveles de linfocitos.

SUGANE y OSHIMA (1.982) en un estudio de la eosinofilia en sangre periférica entre ratones congénitamente atímicos (nu/nu) y ratones heterocigotos (nu/+) inoculados con 500 huevos de T.canis, observan que la infiltración eosinofílica y la formación del granuloma alrededor de la larva en el músculo esquelético, es más débil en nu/nu que en nu/+. Encuentran que los eosinófilos en ratones nu/+ alcanzan un pico el día 10 p.i. y luego cae gradualmente, incrementándose de nuevo en un pequeño pico el día 28 p.i.. Observan que la eosinofilia en nu/nu también alcanza su pico máximo el día 10 p.i., pero luego cae rápidamente sin producir un segundo pico. Afirman que la elevada respuesta eosinofílica en ratones infestados con T.canis parece ser, pues, dependiente de células T en lo que se refiere al segundo pico.

OSHIMA (1.983), a fin de poder elucidar la posible relación entre la eosinofilia y la producción de IgE en la primera fase de las infestaciones por T.canis, utiliza ocho cepas congénitas de ratones (AKr, C3H/He, CBA, BALB/c, DBA/2, SJL, A-SW, C57BL/6 y A/J). Con los ratones SJL obtienen la respuesta eosinofílica más alta, mientras que los ratones A-SW, que tienen el mismo haplotipo H-2, aportan el nivel más bajo de eosinofilia: $13.500 \pm 900 \text{ Eo/mm}^3$ (29,02% del total de leucocitos) y $2.200 \pm 100 \text{ Eo/mm}^3$ (4,73% del total de leucocitos) respectivamente. Miden los niveles de IgE por títulos de P.C.A. con antígeno E/S larvario y observan que la cepa SJL, que presenta una alta respuesta eosinofílica, muestra sin embargo, la respuesta más baja de IgE.

El mismo autor (OSHIMA, 1.983) estudia la destrucción de larvas de T.canis "in vitro" por eosinófilos. Añade sobre las larvas mantenidas en Medio Mínimo Esencial estéril, eosinófilos recolectados de exudado peritoneal de ratones BALB/c y suero fresco de ratón. Al añadir el suero observa una marcada adherencia de los eosinófilos a la superficie de la larva. Si el suero lo trata previamente con EDTA no aprecia adherencia de eosinófilos y si lo trata con EGTA no inhibe la adherencia. Afirma que estas observaciones sugieren que la adherencia de eosinófilos a la superficie de la larva requiere la activación del complemento por la vía alternativa. Después de 72 horas de adherencia de eosinófilos a la cutícula, observa que las larvas permanecen activas y no se aprecian daños estructurales. Dicho autor, intenta explicar estos fenómenos sugiriendo que una simple "oleada" de ataque por parte de los eosinófilos no es suficiente para matar las larvas, siendo necesarios varios ataques para acabar con las mismas.

KAYES (1.984) observa en ratones CBA/J infestados con 250 huevos de T.canis, que a los seis días p.i., el índice esplénico es 3,5; alcanzando el pico máximo entre los cinco y 14 días p.i., para disminuir ligeramente. Utilizando mitógenos, observa que la respuesta de los linfocitos procedentes de ratones infestados, es mayor o igual que la de los controles, y que los linfocitos no estimulados por mitógenos, de ratones parasitados, incorporan 10 veces más timidina tritiada que los controles durante las dos primeras semanas. Por otra parte comprueba que el antígeno de huevo es capaz de inducir la transformación blástica, con una respuesta que alcanza un pico máximo en las dos primeras semanas, comprobando que se debe a células T.

Estudiando estos resultados, sugiere, que en ratón blanco, T.canis provoca esplenomegalia intensa precoz (una semana postinoculación oral). Afirma que estos resultados de transformación blástica, parecen indicar que la esplenomegalia se debe en gran parte a la proliferación de pulpa blanca; y el aumento de la respuesta a mitógenos, indicaría que T.canis no provoca una estimulación policlonal inespecífica, ya que la respuesta positiva a antígeno de huevo, sugiere que al menos una parte de la linfoproliferación es antígeno dependiente.

SUGANE y OSHIMA (1.984, b) fraccionan el antígeno E/S aplicando el medio de cultivo de las larvas a una columna de Sephadex G-25, con lo que aislan cuatro fracciones (Fr1, Fr2, Fr3 y Fr4). Administran cada fracción

por separado, por implantación de bombas miniosmóticas en la cavidad peritoneal de ratones, estudiando los subsiguientes cambios eosinofílicos en sangre periférica. Observan que la fracción Fr1 da lugar a una eosinofilia intensa, y el resto de las fracciones no; además demuestran que las fracciones Fr1 y Fr3, son capaces de activar el complemento, elaborando la hipótesis de que la fracción Fr1 podría ser antigénica y alergénica, pudiendo inducir eosinofilia y activación del complemento.

SUGANE y OSHIMA (1.985) tras una infestación con 500 huevos de T.canis, observan que los eosinófilos en sangre periférica de ratones SJL se incrementan alcanzando un pico el día 14 p.i., de $20.000/\text{mm}^3$ de sangre, lo que supone un 43% del total de leucocitos, para después descender. Las células mononucleares y los neutrófilos no se elevan tanto como los eosinófilos. Al administrar una inyección de ciclofosfamida (150 mg/kg) simultáneamente a la infestación, observan que los leucocitos descienden rápidamente pero luego los eosinófilos se elevan hasta alcanzar un pico también el día 14 p.i. de $60.000/\text{mm}^3$ (75% del total de leucocitos), descendiendo después de nuevo. Por lo que respecta a las células mononucleares, observan que empiezan a elevarse el día siete p.i. y alcanzan el pico máximo el día 18 p.i., lo cual es cuatro veces el nivel normal, volviendo a la normalidad el día 22 p.i.; y que los neutrófilos se incrementan hasta alcanzar el pico el día siete p.i. y vuelven a su nivel normal el día 22 p.i..

AKAO y col. (1.986) inoculan ratones con 500 huevos embrionados de T.canis, no observando la formación de granulomas en el hígado de los mismos. Reinoculan algunos animales a las siete semanas de la primera inoculación, encontrando una semana después, larvas en hígado rodeadas de abundantes eosinófilos, aunque sin formación de granuloma. Observan la aparición de éste a las dos semanas de la reinfestación, consistente en abundantes eosinófilos, células epiteliales y plasmáticas. Hacia la séptima semana, encuentran que algunas larvas son encapsuladas por finos tejidos conectivos. En este momento observan que el infiltrado eosinofílico es menor que dos semanas tras la reinfestación.

SUGANE y MATSUMURA (1.987) observan una marcada variación en cuanto a la eosinofilia entre ratones infestados con T.canis en función de la cepa murina. Consiguen ratones quimera por radiación mutua entre ratones con una

alta y baja respuesta en términos de eosinofilia y comparan ésta última entre los respectivos donantes y receptores. Como resultado observan que el grado de eosinofilia y su curso a lo largo del tiempo es similar en los ratones quimera y los donantes. Según dichos autores esto sugiere que los genes que regulan la herencia de este carácter, marcada eosinofilia en ratones infestados con T.canis, podría expresarse en células derivadas de la médula ósea.

HIGA y col. (1.990) observan un pico en la eosinofilia de sangre periférica el día 14 p.i., en ratones C57BL/6 inoculados con 1.000 huevos embrionados de T. canis, que a continuación decae gradualmente hasta el fin de la experiencia el día 28 p.i..

DIMAYUGA y col. (1.991) miden los niveles de eosinofil-peroxidasa (EPO), enzima marcador específico de los gránulos eosinofílicos, en homogeneizados de pulmones y corazón de ratones infestados con T. canis, y recuperan los eosinófilos de los pulmones de estos mismos ratones durante un periodo de seis semanas p.i.. Observan una marcada acumulación de EPO en pulmones, desde el día 14 p.i. hasta la sexta semana p.i. y asocian la mayoría de la EPO con los eosinófilos que constituyen los infiltrados eosinofílicos pulmonares característicos del síndrome de L.M.V.. Sugieren pues, que la degranulación de los eosinófilos produce el depósito de este enzima en el parénquima pulmonar. En cuanto al miocardio, encuentran los niveles máximos de EPO el día 14 p.i., descendiendo a continuación durante las seis semanas que dura la experiencia. Estos niveles suponen aproximadamente 1/3 de los observados en los pulmones de los mismos ratones. Estos autores concluyen que en ratones infestados con T. canis, la presencia de un elevado número de eosinófilos puede conducir, además de a una marcada fibrosis miocárdica (consecuencia de la miocarditis eosinofílica severa), a un serio daño cardiopulmonar por la acción peroxidasa del enzima degranulado por los eosinófilos.

2.12.3.- PROTECCION

Las infecciones causadas por protozoos y helmintos parásitos son característicamente prolongadas. Durante mucho tiempo los parasitólogos creyeron que no existía una inmunidad efectiva contra la mayoría de los pa-

rásitos, pero la prevalencia de diseminadas y exacerbadas infecciones en pacientes inmunodeprimidos alteró este punto de vista. Hoy está aceptado que la inmunidad adquirida es lo normal, pero también que el parásito es capaz de escapar a sus consecuencias evadiendo la respuesta inmune. Esta evasión tiene importantes consecuencias, porque por un lado es la causa de las inmunopatologías que constituyen un peligro real en las infecciones y, por otro, supone una restricción mayor en el desarrollo de vacunas.

Diversos trabajos indican que las larvas de T. canis son capaces de sobrevivir en los tejidos del hospedador por extensos períodos de tiempo sin ser destruidas por reacciones del mismo <Sprent (1.953) -seis meses en ratones-; Beaver (1.986) -nueve y diez años en monos->. Estas observaciones suscitan la cuestión de si los ratones y otros hospedadores paraténicos, como por ejemplo el hombre, pueden desarrollar una inmunidad protectora frente a este patógeno.

2.12.3.1.- PROTECCION FRENTE A T. canis.

2.12.3.1.1.- Protección en el hospedador paraténico: animales de laboratorio

2.12.3.1.1.1.- Protección mediante infestaciones previas con huevos embrionados

El primer informe sobre el intento de inducir resistencia a T. canis en ratones es de LEE (1.960) quien infesta ratones con 2.000 huevos embrionados en dosis simple y en dosis fraccionadas. Los ratones que reciben sobreinfestación tienen cerca de un 20% de larvas menos que los controles a las ocho semanas de la infestación, y las larvas se acumulan preferentemente en hígado.

OLSON (1.962, a, b) también afirma que las primeras infestaciones con T. canis o en menor medida con A. lumbricoides (pero no con T. spiralis), retrasan la migración de T. canis a nivel del hígado de los ratones y reducen la supervivencia de las larvas.

IZZAT y OLSON (1.970) no pueden demostrar protección por infestaciones previas homólogas cuando se dan dosis de recuerdo con T. canis, pues las larvas en la necropsia no presentan diferencias significativas con los controles. Mediante digestión encuentran una media de larvas por ratón problema de 2.029, la cual no difiere significativamente de la media de 1.743 larvas por ratón control ($p>0,1$). Inoculan una dosis de 3.000 huevos y reinfestan el día 28 con otros 3.000, efectuando el sacrificio de los animales el día 42 p.i.

Según estos autores, si se extrapolan los resultados a humanos, la resistencia de un niño a la reinfestación con larvas de T. canis no es diferente a la que presenta en la primera exposición, al menos en términos de carga larvaria.

SCHUMUNIS y PACHECO (1.970) muestran que sólo provocan protección las infestaciones que duran más de 30 días. Los datos de LEE (1.960) y OLSON (1.962) se confirman más tarde por KATO (1.973).

A diferencia de estos trabajos, KONDO y col. (1.976) muestran que la infestación con 500 huevos embrionados dividida en 5 a 10 dosis, reduce el número de larvas de una infestación posterior con 1.000 huevos. Dividen los ratones en tres grupos homogéneos: el primero de ellos recibe cinco dosis de 100 huevos seguido de la reinfestación con 1.000 huevos; el segundo recibe 10 dosis de 50 huevos, reinfestándose de la misma forma y al tercero o control se le da sólo una dosis de 700 huevos embrionados. Las tasas de larvas recuperadas en cada uno de los grupos respectivamente son del 8,68%; 12,8% y 30,42%. Por el contrario las tasas de recuperación sólo en hígado son del 1,96%; 7% y 0,02%. Experiencias posteriores confirman que el número de larvas recuperadas del hígado de los ratones sensibilizados va incrementándose siempre significativamente, a medida que aumenta el número de dosis inmunizantes y por ello sugieren que el mecanismo inmunológico a nivel hepático puede jugar un papel importante en la invasión del hospedador por las larvas de T. canis.

SUGANE y OSHIMA (1.982) infestan ratones BALB/c normales (nu/+) y atímicos (nu/nu) y los examinan a las dos, cuatro y seis semanas p.i.. A diferencia de los ratones normales, los atímicos responden con menor eosinofilia y menos granulomas, y fracasan en la reducción del número de

larvas en el músculo en función del tiempo. En la reinfestación, SUGANE y OSHIMA (1.983, a), recuperan menos del 11% de la dosis de recuerdo de los hígados de los ratones atímicos, pero más del 50% de los hígados de los ratones intactos. Concluyen que la infestación previa en los ratones normales, causa reacciones inmunes, probablemente mediadas por células, que favorecen la retención de las dosis de recuerdo en hígado.

BRINDLEY y col. (1.985) expone que los ratones altamente resistentes a Nematospiroides dubius responden a la infestación por T. canis con una eosinofilia más alta, con mayor actividad de anticuerpos y más acumulación de larvas en hígado (inhibiéndose ampliamente la migración hacia cerebro y músculo esquelético) que los ratones de baja resistencia.

KAYES y col. (1.985) estudian la respuesta inmunológica de ratones CBA/J infestados con distintas cantidades de huevos embrionados de T. canis, con el fin de determinar la menor infestación capaz de perturbar el sistema inmunitario del hospedador. Según estos autores los resultados indican que diferentes respuestas del hospedador tienen umbrales diferentes de sensibilización y sugieren que las reacciones a las larvas, las cuales requieren complicadas interacciones entre distintos componentes del sistema inmunitario, pueden no ocurrir en infestaciones muy pequeñas.

CONCEPCION y BARRIGA (1.985) inoculando 2.000 huevos embrionados/ratón en infestación simple, doble y triple, deducen que una sólo infestación con T. canis parece producir inmunosupresión, mientras que dos ó tres provocan inmunoprotección.

Tras la infestación simple, sacrifican los ratones a los cinco y 200 días p.i. y encuentran 282 y ninguna larva respectivamente. Con la infestación doble (día 0 y día 334 p.i.), sacrificando los animales a los 133 días de la segunda inoculación, obtienen una media de 999 larvas. Concluyen que puesto que a los 200 días de la infestación simple no encuentran larvas, todas las encontradas tras la infestación doble deben proceder de la segunda inoculación, y como además recuperan muchas más larvas (999 >> 282) que en el caso de la infestación simple, esto implica que la primera inoculación favorece la supervivencia de la segunda inoculación. La infestación triple (día 0, día 334 p.i., y día 133 después de la segunda infestación), sacrificando los animales a los cinco días de la tercera

inoculación, proporciona una media de 994 larvas/ratón, resultado prácticamente idéntico al de la infestación doble. Esta infestación triple supone, además, más larvas en hígado (parásitos nuevos) y menos en cerebro y canal (parásitos viejos) que la infestación doble.

De estas diferencias entre los tres tipos de infestación y, puesto que en ausencia de inmunidad protectora, los ratones con triple infestación tendrían que tener unas 300 larvas más que en la doble, concluyen que la segunda infestación produce suficiente inmunidad para destruir a parte de los parásitos nuevos y de los preexistentes.

AKAO (1.985) observa una retención hepática en ratones reinfestados con larvas de T. canis, pues estos tienen más larvas (57,5-160,6) que los que reciben una sólo infestación (3,8-15,6).

PARSONS y GRIEVE (1.990, a) estudian el efecto de distintas dosis de huevos embrionados de T. canis y observan una retención hepática de muchas de las larvas procedentes de una dosis de recuerdo. Infestan ratones C57BL/6J con dosis iniciales de 5, 25, 75, 125 ó 250 huevos embrionados, recibiendo el día 28 p.i. la dosis de recuerdo. Al sacrificar los animales los días 7, 14 y 21 postreinfestación (p.r.), aprecian retención en el hígado de los que habían recibido dosis sensibilizante de 25 huevos o mayores. En los días 7 y 14 p.r., el nivel de retención se va incrementando con la dosis sensibilizante hasta una dosis 75 huevos. Encuentran el pico en el nivel de retención larvaria los días 14 y 21 p.r., después de dosis sensibilizantes de 125 y 250 huevos respectivamente.

En experiencias posteriores, inoculan ratones de distintas cepas y haplotipo (H-2) diferentes (C57BL/6J-b; SWR/J-q; AKR/J-k; C3H/He-k; BALB/cByJ-d; DBA/2J-d; SJL/J-s) con objeto de estudiar la influencia del genotipo del hospedador murino en el nivel de retención hepática. Con dosis sensibilizante de 125 huevos y dosis reinfestante de 500 el día 28 p.i., determinan la retención larvaria el día 14 p.r.. La cepa C57BL/6J retiene significativamente más larvas que la cepa DBA/2J (73 larvas frente a 18,7) para una $p < 0,01$ y todas las demás retienen larvas a un nivel menor, pero estadísticamente similar al de C57BL/6J. Afirman que la cepa C57BL/6J es más adecuada para el estudio de la retención hepática a las dos semanas

p.r. y que para esta cepa la dosis sensibilizante tiene el umbral en 75-125 huevos.

PARSONS y GRIEVE (1.990, b) continuando con el trabajo anterior, estudian la distribución larvaria de una dosis de recuerdo en ratones C57BL/6J. Inoculan con una dosis inicial de 125 huevos embrionados de T. canis y reinfestan el día 28 p.i. con 500 huevos, determinando la distribución los días 1/2, 1, 2, 3, 5 y 6 p.r..

Observan patrones migratorios similares en el lote sensibilizado y en el control para todos los órganos, pero el máximo hepático aparece el primer día p.r. en el control de reinfestación (340 larvas) y se retrasa hasta tres días p.r. en el sensibilizado y reinfestado (320 larvas). A partir de este día observan que el número de larvas va disminuyendo paulatinamente. En el lote sensibilizado y reinfestado, recuperan una media de 0, 15, 17, 8 y 19 larvas en pulmones, hígado, mesenterio, cerebro y músculo esquelético respectivamente, a las 12 horas p.r.. En el control de reinfestación no recuperan ninguna larva en pulmones, dos en hígado, 37 en mesenterio y ninguna en cerebro ni en músculo esquelético a las 12 horas p.r., lo que indica que para todas las localizaciones extraintestinales, excepto el mesenterio, la mayoría de las larvas presentes a los 12 horas p.r., proceden o son residuales de la dosis sensibilizante.

En una experiencia posterior, determinan sólo las larvas en hígado, músculo esquelético y cerebro de cada ratón y en los ojos de cada grupo de ratones, a los 4, 8, 12 y 16 semanas p.r.. En este caso el número de larvas en hígado del lote sensibilizado es similar a los cinco días y a las 16 semanas p.r., lo que supone que las larvas quedan atrapadas en este órgano en lugar de retrasar su migración a otros sitios del cuerpo. Indican que la retención larvaria no protege los ojos ni el cerebro de los ratones sensibilizados y reinfestados, ni tampoco provoca la muerte de las mismas.

2.12.3.1.1.2.- Protección mediante larvas irradiadas

La irradiación de larvas infestantes de nematodos que se desarrollan a posteriores estadios en el hospedador, causa la muerte del parásito. Esta sucede algún tiempo después de la infestación y no interfiere en la producción de inmunidad específica (JOVANOVIĆ, 1.964; POYNTER, 1.964; MILLER, 1.971). Puesto que la irradiación afecta a la síntesis de proteínas y a la actividad enzimática (OKADA, 1.970), es posible que incluso los parásitos que no evolucionan en el hospedador, como es el caso de las larvas hipobióticas de T. canis en el hospedador paraténico, puedan verse afectadas por la irradiación.

BARRIGA y MYSER (1.987) ensayan este método y para ello infestan ratones con 2.000 huevos embrionados de T. canis normales y con 2.000 huevos embrionados de T. canis irradiados, investigando a continuación el número de larvas en hígado, pulmones, cerebro y canal, a los 5, 20 y 33 días p.i.. Las dosis de 60, 90 y 150 Kr de rayos X inhibe la migración de las larvas desde hígado y pulmones. El día 33 p.i., encuentran una proporción de larvas en hígado y pulmones frente a las larvas en cerebro y canal de 0,16 en los ratones testigo; 0,42 en los ratones inoculados con huevos sometidos a 60 kr; 0,98 en los irradiados con 90 kr y 23,3 con 150 kr. En cuanto a la carga total de parásitos obtenidos, los días 20 y 33 p.i., en los ratones control, es del 29% y 8% respectivamente; en los de 60 kr del 18% y 12%; en los tratados con 90 kr del 8% y el 4%; y del 0,9% y 0,3% respectivamente en los sometidos a 150 kr.

En esta experiencia, observan que las larvas de T. canis al ser irradiadas se hacen menos patógenas, migran menos y mueren más deprisa que los parásitos no irradiados durante los primeros 20 días de la infestación, pero sobreviven mejor que los parásitos normales pasado este tiempo. Esta prolongación del período de vida tras la irradiación no se conocía en nematodos, pero sí se ha ratificado en el caso de insectos adultos, los cuales, como las "larvas durmientes" de T. canis, no poseen tejidos que proliferen rápidamente (DUCOFF, 1.976). Estos autores apuntan la posibilidad de que las larvas normales posean mecanismos que se oponen a las defensas peritoneales del hospedador (macrófagos) y que éstos se inhiban por la irradiación.

2.12.3.1.1.3.- Protección mediante antígenos parasitarios

2.12.3.1.1.3.1.- Protección mediante extractos antigénicos

IZZAT y OLSON (1.970) no consiguen resistencia a la reinfestación con infestaciones homólogas de T. canis en los ratones, pero si obtienen resultados más esperanzadores al intentar la inmunización con extractos antigénicos de adultos. Inyectando 1 mg del antígeno indicado de T. canis en 0,1 ml e igual volumen de adyuvante completo de Freund en diferentes tiempos, hasta un total de 4 mg de antígeno, observan, tras la infestación con 3.000 huevos embrionados el día 28 y posterior digestión de los órganos a los 42 días, que la media de larvas en los grupos inmunizados es significativamente menor que en los controles, alcanzándose un porcentaje de reducción del 52,79%. Sin embargo, comprueban que la inmunización con extractos de A. lumbricoides no produce efecto protector alguno.

KATO (1.973) induce una resistencia parcial a las infestaciones con T. canis mediante inyección de extractos de T. canis y A. suum.

CONCEPCION y BARRIGA (1.985) observan que dos inyecciones de un extracto soluble de larvas infestantes de T. canis produce una ligera pero consistente protección frente a las reinfestaciones.

BARRIGA y CARRILLO (1.987) preparan un extracto total de huevos embrionados y lo separan por centrifugación en una fracción soluble y una fracción particulada, inyectando ratones los días 1, 45, y 75 con cada fracción aislada, en adyuvante completo de Freund, o con lipopolisacáridos de E. coli (LPS). La infestación de los ratones siete días después de la última inoculación, la recuperación de las larvas 7-10 días más tarde y la comparación con la carga parasitaria de los ratones control, muestran que: la inyección del extracto soluble sólo, reduce la carga parasitaria de los ratones en un 37%; el extracto soluble con LPS la reduce en un 76% y el extracto particulado con adyuvante completo de Freund la aumenta en un 60%. Este resultado hace pensar en la posible inmunosupresión del hospedador causada por los productos parasitarios de T. canis.

Los mismos autores realizan Western blots con extractos solubles de T. canis frente al suero de conejos infestados cinco veces, revelando que este animal reconoce tres antígenos en un rango de 16.000-20.000 KD de Pm por primera vez después de la segunda infestación. Puesto que en este momento es cuando parece que empieza la resistencia a T. canis, sospechan que estos antígenos están directamente relacionados con la protección.

2.12.3.1.1.3.2.- Protección mediante antígenos de excreción-secreción larvaria

NICHOLAS y col. (1.984) tratan de evaluar la actividad biológica del antígeno E/S de T. canis, observando que los ratones hiperinmunizados con dicho antígeno en adyuvante, responden con una significativa resistencia a la infestación por T. canis. Immunizan ratones CBA con tres inyecciones subcutáneas de 0,05 ml de antígeno E/S en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (cada inyección contiene 1 ug de proteína), dejando tres semanas de intervalo entre dosis y los infestan tres semanas después de la última dosis con 500 huevos embrionados de T. canis. Sobre esta base hacen tres experiencias sacrificando los animales a distintos tiempos, el día 21, el día 20 y el día 10 p.i.:

En la primera, el número de larvas que completan la migración y llegan a establecerse en musculatura y en cerebro está muy reducido en comparación con el grupo control (82,59% de reducción para musculatura y 55,65% de reducción para cerebro).

En la segunda sólo determinan el número de larvas que se alojan en cerebro, y la media recuperada de los cinco ratones inmunizados es de 201 +/- 99 larvas, y para los no inmunizados de 552 +/- 78 larvas.

En la tercera experiencia observan como en los ratones inmunizados, la migración larvaria hasta cerebro y musculatura desde hígado y pulmones no se completa, detectándose una retención hepática del 70,27% y pulmonar del 78,04%. Secciones histológicas muestran intensas reacciones inflamatorias frente a las larvas en los dos órganos.

De estas experiencias deducen que esta inmunización retrasa la migración de las larvas desde el hígado, y que el antígeno E/S parece jugar un papel importante en la biología de T. canis en el hospedador paraténico y es un blanco de la respuesta inmunoprotectora del mismo.

2.12.3.1.1.4.- Protección mediante transferencia de células y suero inmune.

AKAO (1.985) observa que la transferencia pasiva de suero de ratones infestados a ratones no infestados produce una retención significativa de larvas en hígado cuando son infestados (104,2 larvas frente a 5,2-19,5 larvas respectivamente). Los eosinófilos sin embargo permanecen similares en ambos casos.

CONCEPCION y BARRIGA (1.985) estudian la inmunoprotección en ratones mediante transferencia de células de nódulos linfáticos mesentéricos y suero inmune. Para ello infestan ratones con huevos embrionados de T. canis los días 1 y 100 y recogen las células antes mencionados así como el suero correspondiente. Inyectan ratones libres de parásitos con dos millones de células o con 0,125 ml de suero/15 g. de peso, o con células y suero, infestándolos 24 horas más tarde. Al comparar el número de larvas recuperadas a los cinco días p.i., observan que los ratones de experimentación presentan cerca de un 40% menos de larvas que los ratones control. La transferencia de células supone la reducción del número de parásitos en hígado y pulmones, mientras que la transferencia de suero disminuye el número de parásitos en canal y cerebro. La combinación de células y suero presenta una acción sinérgica en pulmones y cerebro, pero antagónica en hígado y canal.

2.12.3.1.2.- Protección en el hospedador definitivo

STOBERNACK (1.988) ensaya como técnica de inmunización en perros, la implantación I.P. de cámaras de difusión conteniendo larvas de segundo estadio de T. canis. La implantación de 20.000 larvas en perras durante el parto, seguida de una reinfestación con 20.000 huevos embrionados a los 10 días, muestra una infestación no patente reducida y un menor número de larvas que pasan con la leche, en comparación con un control primario de

infestación. Observan que todas las infestaciones desarrolladas en perros a los que habían sido implantados 20.000 a 160.000 larvas y reinfestadas 49 días después, son menores que en los controles. Encuentran que el número de larvas somáticas sin embargo, aumenta con la dosis de larvas implantadas más alta, y que las cámaras se mantienen durante 80 días o menos, y se rodean sólo de unos pocos macrófagos y granulocitos polimorfonucleares. En los periodos de implantación más prolongados, aparece una reacción tisular pronunciada, similar a la formación de abscesos y las larvas de T. canis dentro de las cámaras de difusión aumentan en grosor pero no en tamaño, y ninguna se desarrolla a tercer estadio, sobreviviendo la mayoría a los 80 días de la implantación.

2.12.3.2.- PROTECCION FRENTE A OTROS PARASITOS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES

La tecnología de los anticuerpos monoclonales representa un poderoso instrumento en el estudio de la Inmunología Parasitaria. Además de su utilización en los campos del diagnóstico, del análisis y purificación de antígenos o en el estudio biológico de la actividad de los anticuerpos, otra posible utilización, menos estudiada hasta el momento, es la de su capacidad protectora frente a distintos parasitismos, por transferencia de inmunidad pasiva "in vivo".

En el caso concreto de la toxocarosis experimental, no se han realizado hasta el momento estudios sobre este tema, si bien se ha comprobado su eficacia sobre otros modelos parasitarios.

YOSHIDA y col. (1.980) obtienen un anticuerpo monoclonal (IgG1) frente a una proteína de superficie de esporozoitos de Plasmodium berghei (Pb44). Observan que la incubación de los esporozoitos, bien con el monoclonal intacto, bien con los fragmentos Fab, anulan la infectividad de los mismos, ya que induce la neutralización de los esporozoitos "in vivo" (POTOCNJAK y col. 1.980) e inhibe la invasión celular "in vitro". Además, con la transferencia pasiva a ratones, de tan sólo 10 ug de este anticuerpo purificado, obtienen una completa resistencia a la reinfección con esporozoitos.

FREEMAN y col. (1.980), en un estudio de malaria en roedores, observan que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos de los merozoitos, pero no contra otros antígenos de Plasmodium, son protectores en experiencias de transferencia pasiva de inmunidad.

GRZYCH y col. (1.982) obtienen un anticuerpo monoclonal IgG2a, después de la fusión de células de bazo de ratas LOU/C infestadas con S. mansoni durante cinco semanas y células de mieloma no secretor de rata (IR983F). Las experiencias de transferencia pasiva de inmunidad llevadas a cabo con el fluido ascítico IPLSm1, (que contiene el monoclonal IgG2a), muestran un significativo nivel de protección pasiva frente a la posterior infestación. Llevan a cabo dos protocolos diferentes:

En el primero se administran fluido ascítico del clon IPLSm1, fluido ascítico control (IR983F) y solución salina, vía I.V. (2ml/animal) a ratas expuestas cuatro horas antes a 1.500 cercarias de S. mansoni y miden el nivel de inmunización por recuperación de las esquistosómulas de los pulmones a los cinco días p.i.. En todas las experiencias observan que los animales que reciben fluido ascítico del clon IPLSm1, presentan menos cantidad de esquistosómulas en pulmones cuando se comparan con los que reciben fluido ascítico control o solución salina. Obtienen unos niveles de protección que oscilan entre el 27% y el 58%, (resultados estadísticamente significativos a una $p < 0,05$).

En la segunda serie de experiencias, inyectan ratas con el anticuerpo monoclonal IgG2a, fluido ascítico control y solución salina, cuatro horas después de la infestación con 1.000 cercarias. La carga parasitaria se evalúa tres semanas más tarde por perfusión del hígado. El nivel de protección obtenido con el anticuerpo monoclonal específico IgG2a, oscila entre el 53% y el 62% y los resultados son altamente significativos ($p < 0,001$), no registrándose efecto protector ninguno por inyección del fluido ascítico control, ni con el fluido ascítico obtenido de clones productores del anticuerpo monoclonal IgG2a frente a la IgE humana.

ZODDA y col. (1.982) obtienen hibridomas de ratón secretores de anticuerpos monoclonales frente a S. mansoni y demuestran la capacidad de estos anticuerpos para proteger a ratones frente a la infestación. Estudian cinco mezclas diferentes de fluidos ascíticos. Cada mezcla consta de cuatro flui-

dos ascíticos que contienen anticuerpos monoclonales que reconocen las esquistosómulas. Cuando una mezcla trasfiere resistencia con éxito, repiten el experimento usando un fluido ascítico individual.

El protocolo experimental utilizado por estos autores consiste en inyectar el día 0, 1 ml de fluido ascítico (con partes iguales de los cuatro fluidos ascíticos, o el fluido individual diluido a 1/4) a ratones CB6F₁/J. El primer día p.i. inyectan los ratones con 500 cercarias y el día dos p.i. los inyectan de nuevo por vía I.P. con 1ml de fluido ascítico. Determinan el número de helmintos adultos por perfusión portal a las cinco ó seis semanas p.i.. Dividen los animales control en dos grupos: uno de los controles no tratados y otro de animales que reciben un fluido ascítico de una línea celular (N34-4) que no secreta anticuerpos frente a S. mansoni.

En una primera experiencia, al comparar los adultos recuperados en el grupo control no tratado, en el control tratado con fluido ascítico que contiene anticuerpos frente a S. mansoni y en el grupo al que se administra una mezcla de los cuatro fluidos ascíticos con distintos anticuerpos frente a S. mansoni, observan que en este último la carga de helmintos se reduce del 39 al 55%. Con una segunda experiencia demuestran que esta capacidad protectora se debe a un sólo anticuerpo monoclonal (3 AF12-D6), el cual reduce la carga parasitaria en un 48% comparando con los no tratados, observándose así mismo que el grupo tratado con la mezcla de fluidos ascíticos y el tratado con el anticuerpo monoclonal 3 AF12-D6 tienen cargas similares de helmintos.

HAQUE y col. (1.983) obtienen un anticuerpo monoclonal de clase IgM frente a Brugia malayi, fusionando linfocitos esplénicos de ratones BALB/c infestados con larvas del parásito y células del mieloma SP02. Al probar este anticuerpo monoclonal en experiencias de transferencia pasiva de inmunidad, resulta una significativa reducción en el número de microfilarias circulantes en ratón. A cada ratón BALB/c se le administran 0,250 ml de sobrenadante del hibridoma AA44, y una vez inmunizados se inoculan por vía I.V. con 10.000-100.000 microfilarias de B. malayi, observándose el día siete p.i., un porcentaje de resistencia del 70%.

ORTEGA-PIERRES y col. (1.984) obtienen anticuerpos monoclonales en ratón frente a antígenos de superficie de T. spiralis y ensayan su capacidad

para destruir los parásitos "in vivo" e "in vitro". Al evaluar la actividad "in vitro" de dos de estos anticuerpos, el NIM-M5 (IgG1) y el NIM-M1 (IgM) observan que el primero media la adherencia de eosinófilos murinos a la superficie de larvas recién nacidas y vivas, produciéndose posteriormente la muerte de las mismas, efecto que se ve incrementado al añadir suero fresco normal, reflejando la participación del complemento en este fenómeno; mientras que el segundo, IgM, no promueve la adherencia de células ni mata las larvas "in vitro". También examinan el efecto del anticuerpo monoclonal NIM-M5 en el desarrollo de las larvas a estadio intramuscular. Al tratar las larvas con este anticuerpo antes de su inyección a los ratones, junto con la transferencia pasiva de este mismo monoclonal durante tres días, observan una significativa reducción (36-51%) en la proporción de larvas recuperadas por digestión 28 días después. Según estos autores estos resultados sugieren que los anticuerpos capaces de mediar la adherencia de eosinófilos induciendo la destrucción de nematodos "in vitro" también pueden tener un efecto protector frente a la infestación.

HARN y col. (1.984) estudian el papel protector de un anticuerpo monoclonal anti-huevos de S. mansoni, de clase IgG2b, obtenido por fusión de células de bazo de ratones BALB/c infestados con 1.000 huevos de S. mansoni y células de mieloma de la línea NS-1. Realizan dos ensayos de transferencia pasiva: un ensayo pulmonar recuperando esquistosómulas y otro para recuperar helmintos adultos. En el primero inyectan ratones C57BL/6 con 1,5 ml de sobrenadante del cultivo de hibridomas, con 1,5 ml de suero de ratones infestados y con el mismo volumen de suero de ratón control, vía I.P., al menos tres horas antes de la infestación (a.i.), la cual se hace por inyección de 500 esquistosómulas en la vena caudal. Cuatro días más tarde sacrifican los ratones y analizan los pulmones, calculando el consiguiente porcentaje de reducción. El anticuerpo monoclonal resulta tan efectivo o más que el suero de ratones infestados, pues la reducción de la carga parasitaria varía del 57 al 88%, siendo máxima al utilizar como fuente del anticuerpo monoclonal los sobrenadantes concentrados cinco veces.

Para el ensayo de esquistosómulas adultas, administran el mismo anticuerpo monoclonal y el suero control por vía I.P., a las 5-25 horas anteriores a la infestación, que realizan por penetración en el vientre de 100-186 cercarias/ratón y recolectan las esquistosómulas por perfusión de la vena mesentérica a las seis u ocho semanas (los hígado también son

examinados). Obtienen un nivel de protección del 41% para una dosis de 300 ug del anticuerpo monoclonal purificado. Observan además que los fragmentos Fab ligados al antígeno no median protección inmunitaria, deduciendo así que la realmente importante en la capacidad protectora es la fracción Fc.

Los mismos autores comprueban que este efecto protector es dosis dependiente dentro de un rango de 40-150 ug de anticuerpo monoclonal, siendo del 21% para 40 ug de anticuerpo y del 41% para 300 ug del mismo.

GRZYNCH y col. (1.984) obtienen otro anticuerpo monoclonal (IgG2c), por el mismo procedimiento que el IgG2a (GRZYNCH y col. 1.982) y que había resultado protector en ensayos de transferencia pasiva de inmunidad. En este caso el IgG2c secretado por el clon IPLSm3 no muestra ninguna capacidad letal "in vitro" contra las esquistosómulas en presencia de complemento, macrófagos o eosinófilos, pero inhibe fuertemente la citotoxicidad dependiente de eosinófilos mediada por los anticuerpos IgG2a del clon IPLSm1. Demuestran esta actividad bloqueante del anticuerpo IgG2c "in vitro" utilizando fragmentos $F(ab')_2$ e "in vivo" por inhibición de la inmunidad conferida por los anticuerpos monoclonales IgG2a en transferencia pasiva de inmunidad.

Para ello inyectan ratas LOU/C vía I.V. con 2 ml de solución salina, 2 ml de fluido ascítico control (mieloma IR983F), 2 ml de fluido ascítico del clon IPLSm1 productor de IgG2a y 2ml de fluido ascítico del clon IPLSm3 productor de IgG2c junto con 2 ml de ascitis del clon anterior. Calculan el número de helmintos por perfusión del hígado 21 días después de la infestación con 1.000 cercarias y observan que la inyección del fluido ascítico del clon IPLSm1 productor de IgG2a confiere un significativo nivel de protección (48%, $p < 0,005$), mientras que la inyección simultánea de fluido ascítico de los dos clones diferentes produce una brusca disminución de la protección cuando se compara con la inducida por los IgG2a solos ($p < 0,001$). Afirman que estos resultados indican que los anticuerpos bloqueantes juegan un importante papel en la expresión de la inmunidad protectora durante la infestación por Schistosoma.

TARRAB-HAZDAI y col. (1.985) obtienen dos anticuerpos monoclonales 152-66-9B y 152-66-1C frente a antígenos superficiales de esquistosómulas de S. mansoni, por fusión de esplenocitos de ratones DBA/2 convenientemente

inmunizados y células de mieloma NS-1. Prueban estos dos anticuerpos en ensayos de transferencia pasiva de inmunidad en ratones B6D2F1, que reciben tres inyecciones vía I.P. de 0,5 ml de ascitis/ratón 18 horas a.i., en el momento de la misma y cinco días p.i., evaluando a continuación la actividad mediante perfusión hepática a las siete u ocho semanas p.i.. Los resultados suponen un significativo nivel de reducción en la carga parasitaria total de los ratones, del 35 al 36% para cada uno de los anticuerpos monoclonales.

HARRISON y PARKHOUSE (1.986) obtienen anticuerpos monoclonales frente a oncosferas de Taenia saginata por fusión de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados vía I.P. con oncosferas activadas de éste parásito y células de mieloma de la línea X 63-Ag 8658, ensayando la capacidad de protección pasiva y la vida media de cuatro de ellos en el sistema circulatorio de terneros. Inmunizan los animales con aproximadamente 100 ml de cada fluido ascítico por vía I.V. el día -1, dividido en dos dosis iguales administradas con un intervalo de ocho horas, y al día siguiente, día 0, los infestan V.O. con 5.000 huevos de T. saginata. Dos semanas más tarde, se sacrifican y se someten al correspondiente exámen "postmortem". De los cuatro anticuerpos monoclonales probados, observan que el HP2 (IgM) parece promover la muerte del parásito, provocando una reducción en el número de quistes vivos ($p < 0,05$) cuando se compara con los controles: 298,2 frente a 448,4; lo que supone un 33,49% de reducción. Estudian la vida media de los anticuerpos monoclonales en el torrente sanguíneo de los animales y observan que es de 4-5 días para las IgM (HP2, HP3) y de 8-10 días para las IgG (HP5, HP6).

VERWAEDE y col. (1.987) obtienen un anticuerpo monoclonal de clase IgE (B48-14) frente a S. mansoni por fusión de células de nódulos linfáticos mesentéricos de ratas LOU/M inmunizadas con antígeno de Schistosomas adultos y células de mieloma no secretor IR973F de rata, investigando el papel protector del mismo. Para ello inyectan ratas, una hora a.i. con cercarias, con suero de ratas portadoras del hibridoma B48-14, con suero de ratas portadoras del mieloma IR983F y con el de ratas portadoras de un hibridoma productor de una IgE no afín. Al evaluar la carga parasitaria tres semanas más tarde por perfusión hepática, comprueban que el número de helmintos en las ratas inyectadas con la IgE B48-14 se corresponden con un nivel de protección comprendido entre el 43 y el 64%.

GREGOIRE y col. (1.987) trabajando con un anticuerpo monoclonal de clase IgM, obtenido a partir de esplenocitos de ratones inmunizados con cercarias irradiadas de S. mansoni, en experiencias de inmunización pasiva, observan aproximadamente un 40% de protección cuando lo administran a ratones 24 horas a.i. y dos días p.i., o bien ocho días p.i.. Sin embargo cuando lo administran 15 días p.i. este anticuerpo monoclonal fracasa en su efecto protector.

EAST y col. (1.988) obtienen nueve líneas celulares de hibridomas secretoras de anticuerpos monoclonales específicos frente a N. dubius (Heligmosomoides polygyrus), producidos por fusión de esplenocitos o células de nódulos linfáticos mesentéricos de ratones infestados repetidamente con N. dubius y células de mieloma murino de la línea NS-1. Dos de estos anticuerpos, Nd₂ y Nd₃, proporcionan protección pasiva en ratones BALB/c cuando se inyectan en fluido ascítico, como se demuestra por reducción de la fecundidad del parásito y por impedimento en el desarrollo tanto de los machos como de las hembras.

2.13.- TRATAMIENTO

2.13.1.- TRATAMIENTO EN ANIMALES DE LABORATORIO

KATO (1.973) trata animales inoculados con T. canis con dietilcarbamacina a 250 mg/kg durante cinco días consecutivos y observa que el número de larvas recuperadas de los tejidos (incluido el cerebro) es marcadamente menor que en los controles no tratados. Asimismo, observa una ligera caída en los títulos de anticuerpos después de la terapia.

TONGSON y DAYRIT (1.975) observan que di-tetramisol, administrado a 10 mg/kg en días alternos durante dos o tres semanas a ratas inoculadas con 500 huevos de T.canis, reduce significativamente el número de larvas recuperadas de los órganos. Por el contrario, con dosis de 5 mg/kg no obtienen efectos significativos.

YALCINKAYA (1.977) inocula 250-500 huevos/ratón y los trata con tiabendazol (100 mg/kg), empezando a los 90 minutos p.i., 24 y 48 horas p.i. y nueve días p.i., y examina corazón, hígado, riñón, pulmones, bazo y cerebro. Encuentra muy pocas o ninguna larva en los tratados 90 minutos p.i.; en los tratados 24 horas p.i. y necropsiados 48 horas p.i., encuentra algunas lesiones pero menos que en los controles no tratados; y, por último, en los tratados 48 horas p.i. y necropsiados 7-12 días p.i., no encuentra ninguna larva. Respecto al cerebro, encuentra lesiones en los tratados nueve días p.i. y necropsiados 40-120 días después de la inoculación.

SONNEN (1.979) inocula ratones con 100 larvas de T.canis y los trata con varios antihelmínticos a 100 mg/kg por V.O. durante tres días consecutivos, empezando 90-120 días p.i. y sacrificando 14 días después de la primera dosis. Obtiene un porcentaje de reducción del 24%, 40% y 30% respectivamente, con albendazol, cambendazol y mebendazol, administrados a los 90 días, siendo menos eficaces a los 120 días. Sin embargo, no obtiene reducción significativa con fenbendazol, oxfendazol, oxibendazol y flubendazol.

NICHOLAS y STEWART (1.979) estudian el efecto de dos bencimidazoles, fenbendazol y oxfendazol, sobre los estadios larvarios de T.canis en el ratón. Administrando los antihelmínticos oralmente con la dieta, observan que

fenbendazol, a una dosis de 4 g/kg de dieta, con una absorción estimada de 20-30 mg/ratón/día, mata las larvas en cerebro y musculatura cuando el tratamiento se inicia a las dos semanas p.i. (para cuando la fase inicial de la migración ya se ha completado) y se mantiene durante cuatro semanas más, hasta el día 40 en que se sacrifican. Si el tratamiento se acorta a dos semanas, la misma dosis de medicamento no es eficaz. Piensan que tal vez sería posible reducir el período de administración si el tratamiento comenzara antes de la infestación, en lugar de hacerlo una vez que las larvas se han establecido en musculatura y cerebro, ya que quizá las larvas en su migración a través del hígado, pulmones, y circulación sean más susceptibles que las que están ya asentadas en musculatura y cerebro. Sin embargo, al realizar experiencias con fenbendazol marcado con ^{14}C , con objeto de conocer que cantidad de droga se asimila y cómo es retenida en los tejidos, demuestran que ésta permanece durante un corto periodo de tiempo en los tejidos, por lo que sería inefectiva la alimentación medicada antes de la infestación.

Cuando emplean oxfendazol, observan que una absorción del mismo más baja que la de fenbendazol, es suficiente para eliminar casi todas las larvas de cerebro y músculo: 0,5 g/kg de comida, con una absorción oral estimada de 2,4-4 mg/ratón/día. En este caso el tratamiento también es efectivo si comienza antes de la infestación y si continúa sólo durante dos semanas.

HOLT y col. (1.981) infestan ratones con 1.000 huevos de T.canis y tratan lotes con adipato de piperacina (4.000 mg/kg), mebendazol (300-150 mg/kg), oxfendazol (2.000 mg/kg), albendazol (1.000 mg/kg), fenbendazol (2.500 mg/kg) y citrato de dietilcarbamacina (200 mg/kg), empezando 24 horas y hasta cuatro días p.i.. Al sacrificarlos, a las 3-6 semanas postratamiento, observan que no existen diferencias significativas en el número de larvas encontradas en los cerebros de los ratones tratados y de los controles no tratados.

CASAROSA Y LUGETTI (1.982) y CASAROSA y col. (1.983), inoculan ratones con 2.000 huevos de T.canis, tratándolos con 80 mg/kg de ivermectina (v.a. S.C.) 24 horas p.i.. Al efectuar necropsias los días siete y 20 p.i., observan que la migración larvaria queda detenida en hígado y pulmones, sin llevarse a cabo la colonización encefálica. Los mismos autores, en un trabajo posterior -CASAROSA y LUGETTI (1.984)- encuentran que la misma terapia

reduce la colonización larvaria en un 99%, 98% y 92% respectivamente, si se administra inmediatamente después de la infestación helmíntica y dos y cinco días antes de la misma. A la vez observan que la ivermectina no tiene efecto sobre la colonización larvaria del cerebro, cuando se administra 15 y 10 días a.i. y 72 horas p.i.

ABO-SHEHADA y HERBERT (1.984) estudian los efectos antihelmínticos de levamisol (100-50 mg/kg), ivermectina (2 mg/kg), albendazol y fenbendazol (100 mg/kg), frente a larvas de segundo estadio de T. canis en ratón. Administrando el tratamiento los días dos al siete p.i., observan una retención de larvas en hígado y una disminución de la migración larvaria a cerebro y músculo, al comparar con los controles no tratados. Piensan que la mayoría de las larvas retenidas en hígado mueren, ya que no se recuperan a los 35 días p.i., observando una mayor eficacia al administrar la droga por V.O. que por vía S.C.. Con los tratamientos administrados los días ocho al 13 p.i., no obtienen efectos sobre las larvas, por lo que suponen que una vez éstas alcanzan cerebro y músculo no son susceptibles a los antihelmínticos.

ABDEL-HAMEED (1.984, a) estudia el efecto larvicida y larvistático de nueve bencimidazoles (tiabendazol, mebendazol, fenbendazol, albendazol, parbendazol, oxibendazol, cambendazol, flubendazol y oxfendazol). Administra las drogas a ratones en dieta medicada, conteniendo un 0.1% del compuesto puro (130-160 mg/kg/día), empezando 24 horas después de la inoculación con 500 huevos embrionados. Continúa la medicación en dieta durante ocho días, sacrifica la mitad del lote y administra al resto dieta normal, sacrificándolos a los 22 días p.i.. En los ratones sacrificados ocho días postratamiento, observa que todos los productos, excepto tiabendazol, retienen larvas en hígado. En los ratones sacrificados 22 días p.i. sólo obtiene efectos larvicidas significativos con albendazol, oxfendazol y cambendazol, observando grandes variaciones en los porcentajes de larvas retenidas en hígado.

El mismo autor, ABDEL-HAMEED (1.984, b), estudia el efecto de tiabendazol sobre la supervivencia y migración de las larvas de T. canis en ratón. Aunque obtiene bajos efectos larvicidas, observa una marcada inhibición de la migración de las larvas en los tejidos. Encuentra que las larvas quedan atrapadas en hígado cuando se inoculan por V.O. y en pulmones tras la inoculación I.V.. Sus observaciones indican que la droga puede tener un

reversible y progresivo efecto metabólico sobre la larva, relacionado con el tiempo. Para obtener una inhibición significativa, observa que la administración de la droga ha de realizarse en dieta medicada a una concentración del 0,25% o superior, ya que la administración oral periódica de una suspensión de tiabendazol no resulta eficaz en inhibir la migración larvaria. Afirma que los efectos inmovilizadores de la droga sobre las larvas de T. canis la hacen aprovechable para casos de L.M.V., para la prevención de infestaciones prenatales o transmamarias en perros y para suprimir daños tisulares producidos por larvas de nematodos en general.

CASAROSA y col. (1.985) infestan ratones con T. canis y los someten a una terapia de 80 mg/kg de ivermectina a las 24 horas p.i.. Tras recuperar las larvas de estos ratones donantes, las inoculan a un ratón receptor observando que no son capaces de migrar plurivisceralmente. Por el contrario, las larvas de T. canis recogidas de donantes infestados pero no sometidos a ninguna terapia, son capaces de migrar a hígado, pulmones y cerebro de los ratones receptores. Los mismos autores -CASAROSA y col. (1.987)- estudian la inhibición de la migración cerebral de las larvas de T. canis incubadas "in vitro" durante 24 horas a 37°C en solución de Hanks con gentamicina y 15 mg/kg de ivermectina, observando que sólo unas pocas migran a pulmones y que ninguna alcanza el cerebro.

CARRILLO y BARRIGA (1.987) ensayan el efecto de dos dosis de hidrocliclorato de levamisol e ivermectina sobre las larvas de T. canis. Tras infestar ratones BALB/c ByJ con 1.000 huevos embrionados de este parásito, los tratan con hidrocliclorato de levamisol a 6 mg/kg y 12 mg/kg vía S.C.; y con ivermectina a 0,2 mg/kg y 0,4 mg/kg vía intramuscular (I.M.), diariamente desde el día 15 al 28 p.i.. A los 33 días recuperan las larvas de hígado, pulmones, cerebro y canal.

Con la dosis más baja de levamisol (6 mg/kg), observan que desciende significativamente sólo el parasitismo en la canal (en un 17% respecto a los controles) pero no afecta significativamente a toda la carga parasitaria. Con la dosis más alta de levamisol (12 mg/kg) encuentran que disminuye el grado de infestación en todos los órganos y particularmente en cerebro y canal, siendo el parasitismo total sólo del 36% respecto a los controles.

Con la dosis más baja de ivermectina (0,2 mg/kg) obtienen un aumento significativo del número de larvas en pulmones, en un 550% comparando con los controles, pero no provoca efectos significativos en el parasitismo total. Por último con la dosis más alta de ivermectina (0,4 mg/kg) sólo hay una disminución significativa del parasitismo cerebral, si bien el parasitismo hepático y total se ven disminuidos hasta un 40% y 50% respectivamente. Concluyen que estas drogas son ineficaces en la erradicación de las larvas de los tejidos, pero levamisol a 12 mg/kg puede ser útil en las infestaciones sintomáticas.

CUELLAR y col. (1.990, b) estudian la eficacia de la quimioterapia con mebendazol a 100 mg/kg/día durante tres días consecutivos en conejos inoculados con huevos embrionados de T. canis mediante la detección de anticuerpos e inmunocomplejos, en lotes tratados y en controles. En conejos inoculados con dosis simple de huevos (2.000/conejo), observan que la implantación del tratamiento a la tercera semana p.i. induce un aumento de los niveles de anticuerpos postratamiento que alcanzan en muchos casos índices de doble magnitud a los detectados en el lote control. Circunstancia similar encuentran en los conejos inoculados con dosis múltiple (2.000 huevos/conejo semanalmente durante cuatro semanas), los cuales reciben el tratamiento durante la quinta semana p.i..

Por lo que se refiere a la detección de inmunocomplejos, únicamente los detectan a dosis múltiple, observando que tras el tratamiento estos se negativizan manteniéndose a nivel basal durante el resto de la experiencia, a diferencia de lo que sucede en el lote testigo. Concluyen que la detección de anticuerpos no es una técnica válida para monitorizar la eficacia del tratamiento, y sí por el contrario la detección de inmunocomplejos específicos.

DELGADO y col. (1.989) estudian el efecto de albendazol en la toxocarosis experimental en ratones, tras la inoculación de los mismos con 800 huevos embrionados de T. canis. A partir del segundo día p.i., un grupo recibe una dosis simple de albendazol de 9 mg cada 24 horas durante un periodo de ocho días, mientras que un segundo grupo es tratado con 3 mg del medicamento cada ocho horas durante el mismo periodo de tiempo. A los 10 días p.i. sacrifican los ratones de cada grupo y los de sus correspondientes controles. En ambos casos observan que el medicamento reduce el número

de larvas que llegan a cerebro, así como su movilidad. Pero para la misma dosis total de albendazol, la administración de la droga cada ocho horas proporciona resultados significativamente superiores a los producidos por una dosis simple cada 24 horas.

2.13.2.- TRATAMIENTO DE FORMAS LARVARIAS EN EL HOSPEDADOR DEFINITIVO

DUBEY (1.979) estudia la eficacia de fenbendazol frente a larvas tisulares de T. canis, en perros infestados experimentalmente con 10.000 huevos embrionados. Tras administrar, a cuatro de los seis perros infestados, el día 47 p.i., 50 mg/kg del medicamento dividido en dos dosis diarias durante 14 días, observa al final del tratamiento, que no se recuperan larvas del músculo esquelético de los animales que reciben fenbendazol, mientras que de los controles recupera 15 y 42 larvas/g de músculo. Además el número de focos granulomatosos en los pulmones de los perros tratados es marcadamente inferior al de los perros no medicados. Los resultados indican que fenbendazol puede ser efectivo en la prevención de la infestación prenatal en perros.

BOSSE (1.980) investiga la prevención de infestaciones prenatales y lactogénicas en perros mediante la administración de dosis repetidas de carbamatos de bencimidazol. Después de inocular con larvas de T. canis, administra dosis de 100 mg/kg/día, desde el día 30 de la gestación hasta el momento del nacimiento, y posteriormente examina los cachorros, mediante coprología y autopsia en el día 42. Observa que albendazol, fenbendazol, y oxfendazol son fuertemente eficaces frente a los adultos y más aún frente a las formas somáticas, y que por el contrario, mebendazol y flubendazol son ineficaces frente a larvas tisulares. Concluye diciendo que las infestaciones prenatal y lactogénica, puede prevenirse y controlarse mediante el tratamiento regular de las madres con fenbendazol a dosis de 100 mg/kg/día, desde el día 30 de la gestación hasta el momento del nacimiento (BOSSE y col., 1.980; BOSSE y STOYE, 1.981).

Los efectos de estos compuestos frente a larvas somáticas de T. canis, han sido estudiados también por PETRICH y STOYE (1.981) quienes completan el trabajo, mediante la observación del efecto de los fármacos en el título de anticuerpos. En las infestaciones prepatentes observan títulos de

1/20-1/80, a las 2-3 semanas p.i., que no sufren variaciones después del tratamiento con albendazol, fenbendazol y oxfendazol.

LLOYD y SOULSBY (1.983) estudian los efectos antihelmínticos de carbamatos de bencimidazol sobre varios estadios del desarrollo de T. canis. Observan que fenbendazol y albendazol a dosis de 150 mg/kg, durante tres días, producen un 90% de reducción en el número de larvas de segundo estadio presentes en los tejidos, aunque esta reducción no es apreciable en cerebro. Sus resultados sugieren que esta terapia antihelmíntica, puede prevenir las infestaciones prenatales. Sin embargo, si la infestación se adquiere durante el embarazo o la lactancia, cobra mayor importancia la transmisión transmamaria, aunque el tratamiento antihelmíntico de la perra, durante el embarazo, previene la transmisión a sus cachorros. Afirman que alternativamente, la infestación por T. canis puede controlarse a través del tratamiento de los cachorros durante la migración larvaria, ya que, en sus condiciones experimentales, dosis de 100 mg/kg/día, durante 2-3 días, producen un 91-99% de reducción en el número de adultos encontrados, pudiendo eliminarse la tasa residual mediante la administración de flubendazol, a 40 mg/kg en dosis única, a cachorros de 4-5 semanas. Añaden que, este último tratamiento sería necesario repetirlo, para eliminar completamente la infestación de los cachorros.

BURKE y ROBERSON (1.983) también investigan la eficacia del tratamiento con fenbendazol en la reducción de infestaciones prenatales y lactogénicas de cachorros por T. canis. Inoculan perras Beagles con 5.000 huevos embrionados de T. canis, en los días 10, 35, y 60 de la gestación y tratan con fenbendazol, en dieta medicada (50 mg/kg/día), desde el día 40 de la gestación hasta el momento del parto o hasta 14 días después. Mediante el examen "postmortem" de los cachorros a los cinco días de edad, obtienen una eficacia del 64% mediante el tratamiento desde el día 40 hasta el parto y del 89% siguiendo la segunda pauta.

DUWEL y DEGENHARDT (1.983) tratan 10 perras con fenbendazol (25 mg/kg añadido a la comida) durante la preñez, observando que aunque previene la transmisión de T. canis, sin embargo los cachorros permanecen susceptibles a la infestación.

VORBOHLE (1.984) y STOYE y VORBOHLE (1.985) inoculan perras Beagles con 20.000 huevos de T. canis 10 días antes del apareamiento y tratan con fenbendazol (100-150 mg/kg/día), entre los días 20 y 39 de la preñez. En sus condiciones experimentales, todos los cachorros de las hembras controles no tratadas mueren 22-49 días después del nacimiento, así como cinco cachorros de dos hembras tratadas con 150 mg/kg/día. Las alteraciones físicas y degeneración del cerebro y sistema central, observadas en estos últimos, son atribuidas por los autores a la elevada dosis de fenbendazol. En todos los casos comprueban la infestación prenatal, aunque observan un porcentaje de reducción del 92%, referido a formas inmaduras intestinales en cachorros de hembras tratadas.

2.13.3.- TRATAMIENTO EN EL HOMBRE

2.13.3.1.- TRATAMIENTO DE LA LARVA MIGRATORIA VISCERAL

PERRIN y col. (1.975) tratan con relativo éxito a dos pacientes con diagnóstico presuntivo de L.M.V. basado en persistentes lesiones pulmonares, eosinofilia y contacto previo con cachorros parasitados, mediante la administración de tiabendazol a 50 mg/kg/día, divididos en dos dosis, durante dos ciclos semanales. Señalan que uno de los pacientes, un niño de color de 23 meses, tras 15 meses de tratamiento presentaba todavía eosinofilia y sibilancias, pero el resto de los signos, tales como la hepatomegalia, habían desaparecido. El segundo paciente, una niña blanca de dos años y medio, experimenta una gran mejoría al poco tiempo, no presentando recurrencias ni eosinofilia durante los siguientes cuatro años. Observan asimismo que ambos toleran bien el tiabendazol y que no hay toxicidad importante.

DAFALLA y ALI OMER (1.977) describen el caso de un niño sudanés de siete años que presentaba fiebre, hepatoesplenomegalia y alta eosinofilia, con toxocarosis confirmada por inmunofluorescencia, al que tratan con 60 mg de hicantona, manteniéndose la eosinofilia elevada tres semanas más tarde. El posterior tratamiento con 9 mg/kg/día de dietilcarbamacina durante tres semanas, provoca sin embargo, la caída del porcentaje de eosinófilos y remite la hepatoesplenomegalia.

FANNING y col. (1.981) describen el caso de un niño portugués de siete años, con signos y síntomas sospechosos de toxocarosis, positivo a una dilución 1/100 por H.A.I.. Tras el tratamiento con tiabendazol a 25 mg/kg/día durante dos días y mebendazol a 100 mg dos veces durante tres días, observan una mejoría en los síntomas, pero al poco tiempo se le ingresa de nuevo por molestias pulmonares. Responde al tratamiento con aminofilina y salbutamol, pero a causa de la eosinofilia persistente y la hepatomegalia, lo tratan de nuevo con tiabendazol a 15 mg/kg/día durante seis días y un mes más tarde con 25 mg/kg/día durante cuatro días. A los siete meses vuelve a presentar problemas respiratorios y una segunda H.A.I. da un título positivo a 1/400. Tratan entonces con citrato de dietilcarbamacina, 50 mg cuatro veces/día durante tres semanas, y al examinarlo un mes más tarde los síntomas habían ya desaparecido.

MAGNAVAL (1.982) trata a 30 pacientes adultos (de ambos sexos), que habían sido diagnosticados de L.M.V. en base a una hipereosinofilia crónica, análisis coprológico negativo e inmunoelectroforesis, con un gramo de fluoromebendazol/día durante 21 días (a un grupo de 20 enfermos) y con tres gramos del mismo compuesto durante 15 días (a otro grupo de 10 enfermos). Según el citado autor, estos resultados respecto al tratamiento de la L.M.V. por ascáridos con fluoromebendazol, son alentadores en relación a los agentes terapéuticos clásicos, pues se produce la mejora clínica de uno de cada dos pacientes, aun cuando la eosinofilia no experimenta mejorías a corto plazo, sino que por el contrario y paradójicamente se ve elevada, quizás debido a la destrucción aguda de larvas en migración por acción de las dosis más elevadas.

VOLFF (1.982) trata con 100 mg de fenbendazol (divididos en dos dosis/día) durante 10 días, a un niño de siete años y medio, con dolor abdominal, considerable leucocitosis y L.M.V. demostrada mediante microprecipitación. Con la terapia consigue la disminución de los síntomas y que los valores hematológicos (leucocitos, eosinófilos y velocidad de sedimentación) retornen gradualmente a la normalidad en un año.

DUTOIT y col. (1.983) describen el caso de un niño de un año, con toxocarosis que no mostraba mejoría en sus síntomas (astenia y hepatomegalia) tras el tratamiento con tiabendazol. Sin embargo, mediante la administración de flubendazol (400 mg/día, durante dos días y 600

mg/día, durante cinco días), consiguen reducir los síntomas y disminuir gradualmente el título de anticuerpos.

VORTEL y col. (1.983) citan un caso de toxocarosis demostrado por biopsia hepática y título de anticuerpos elevado, que no consiguen disminuir después de la administración de tiabendazol.

BEKHTI (1.984) cita el caso de una mujer de 23 años diagnosticada de toxocarosis, a la que se trata con mebendazol a una dosis de 50 mg/kg/día (tres gramos diarios) durante 21 días. Al cabo de este tiempo se normaliza la eosinofilia, las proteínas séricas, gammaglobulinas y la IgE, no encontrando anticuerpos específicos después de un año.

GIULIANI y col. (1.984) tratan satisfactoriamente con citropiperacina a un paciente con granuloma hepático causado por T. canis.

BASS y col. (1.987) realizan un estudio sobre 153 niños hispanos de los cuales un 16% presenta anticuerpos frente a T. canis por E.L.I.S.A.. Tratan a 11 de los mismos con tiabendazol (dosis de 25 mg/kg durante 1-2 días o de 50 mg/kg durante tres días) realizando su seguimiento durante un año. Concluyen que el tratamiento no parece alterar el curso de la infestación, ya que el recuento de eosinófilos y el título de anticuerpos prevalece.

MAGNAVAL y CHARLET (1.987) tratan a 81 pacientes de L.M.V. con tiabendazol (grupo A, 38 pacientes) o mebendazol (grupo B, 43 pacientes) a 25 mg/kg, en una dosis oral durante una semana. Observan a los pacientes uno, dos y tres meses después del tratamiento, encontrando una eficacia similar (juzgada por los síntomas clínicos) en ambos grupos (59% y 57% respectivamente).

SOBOTA y col. (1.988) tratan a 20 pacientes afectados de toxocarosis larvaria manifestada por los mas variados síntomas clínicos (pulmonares, oftálmicos, viscerales, y menos frecuentemente formas dermatológicas y multiples) con mebendazol, a una dosis diaria de 1.000 mg durante 10-14 días (a la mitad de ellos) y con tiabendazol a una dosis diaria de 1.500 mg (a la otra mitad) durante el mismo periodo de tiempo. En ambos casos observan efectos terapéuticos positivos.

STÜRCHLER y col. (1.989) describen el caso de un ensayo clínico con tiabendazol y albendazol en 34 pacientes con L.M.V. ó T.O., a los que se asigna un tratamiento de cinco días con tiabendazol a 2 x 25 mg/kg/día (15 pacientes) o albendazol a 2 x 5 mg/kg/día (19 pacientes). Al quinto día del tratamiento, seis de los pacientes del grupo tratado con tiabendazol y 11 de los tratados con albendazol, muestran una excelente o buena tolerancia a la droga. La eficacia del tratamiento se ensaya durante 30 semanas, y en el primer grupo observan que permanece una eosinofilia media del 14% y que cuatro pacientes se curan clínicamente. En el grupo de albendazol la eosinofilia media desciende del 10 al 3,5% y se curan seis pacientes. Recomendando, por tanto, albendazol para el tratamiento de L.M.V. y T.O., a una dosis mínima de 10 mg/kg/día durante cinco días.

NAGAKURA y col. (1.989) someten a tratamiento con mebendazol a dos pacientes, hermanos gemelos, en Kanagawa (Japón), que previamente habían sido diagnosticados, clínica e inmunológicamente, de toxocarosis por T. canis tras ingerir hígado crudo y mollejas de gallo. Antes del tratamiento, el estudio hematológico de ambos revelaba los siguientes datos: leucocitosis de 13.200/mm³ y 23.600/mm³ respectivamente, eosinofilia del 60% y 84%; ganmaglobulinas séricas 23,8% y 35,2%; IgG 2.350 mg/dl y 4.170 mg/dl; IgM 378 mg/dl y 239 mg/dl e IgE 1.820 U.I./ml y 6.450 U.I./ml. Tras el tratamiento con mebendazol tres veces al día durante cuatro días, observan que el número de leucocitos permanece dentro de los límites normales, pero la eosinofilia y la hiperganmaglobulinemia persisten. Nueve meses más tarde la eosinofilia desciende al 29% y 24% y la IgE alcanza valores de 2.570 U.I./ml y 1.518 U.I./ml.

SCAGLIA y col. (1.989) relatan el caso de dos pacientes con L.M.V., que padeciendo síntomas clínicos serios, se curan al ser tratados con dos ó tres ciclos de tiabendazol a 25-50 ug/kg/día. Uno de los tratamientos había fracasado con dietilcarbamacina a 5 mg/kg/día durante 21 días. También citan el caso de un paciente que mejora clínicamente tras dos ciclos de albendazol a 400 mg/día durante 21 días, pero sin sufrir descenso alguno en el título de anticuerpos; así como el caso de otro paciente con T.O. cuyo tratamiento con tiabendazol y tres ciclos de dietilcarbamacina resulta un fracaso.

2.13.3.2.- TRATAMIENTO DE LA TOXOCAROSIS OCULAR

O'CONNOR (1.980) afirma que en la T.O., el tratamiento antihelmíntico parece no tener ningún efecto beneficioso y es posible que pueda empeorar la inflamación ocular. Asimismo indica que es conveniente la terapia con corticosteroides, se administren o no los antihelmínticos.

MOLK (1.982) cita el caso de un niño de ocho años diagnosticado de neuritis óptica, cuyo suero en E.L.I.S.A presentaba un título de 1/32. De una agudeza visual inicial de 20/400 se logra una final de 20/20 tras inyecciones de prednisona bajo la cápsula de Tenon.

SMALL y col. (1.989) hacen un estudio retrospectivo del resultado de una cirugía de vítreos en 12 ojos de 12 pacientes con lesión macular producida por infestación por T. canis. La vitrectomía se lleva a cabo en todos los ojos, y después de seis meses, 10 de los 12 ojos presentan total recuperación retiniana, la agudeza visual mejora en siete de ellos, dos no sufren cambios y tres experimentan un descenso en la agudeza visual.

PETITHORY y col. (1.990) en un trabajo de revisión sobre el síndrome de T.O., habla de tres niveles en el tratamiento del mismo: tratamiento antihelmíntico, corticoterapia general y cirugía ocular (vitrectomía).

En cuanto al tratamiento antihelmíntico sugiere que dietilcarbamacina a dosis de 6 mg/kg/día durante tres semanas puede ser utilizada en las formas resistentes a otros terapéuticos (SNYDER, 1.961). Tiabendazol da resultados variables: fracaso, (KAREL y col. 1.977), particularmente en los casos infantiles, (POLLARD 1.979); resultados inciertos, (GLICKMAN y col. 1.985); o mejorías, (CRANE y CHRISTENSEN, 1.981; SCHIMEK y col. 1.979). Se prescribe durante 15 días a una dosis de 30 mg/kg/día en dos tomas durante las comidas. El tratamiento puede repetirse tras un descanso de ocho días. En cuanto a flubendazol, el cual no proporciona resultados claros en el síndrome de L.M.V., ha provocado además el agravamiento de las manifestaciones en dos casos (RECCO y col. 1.988).

La corticoterapia general puede realizarse con tratamiento prolongado a base de prednisona a la dosis de 1 a 2 mg/kg/día, obteniéndose una mejoría en la visión de 20/200 a 15/20 (BYERS y KIMURA, 1.974). Es solamente en

las formas clínicas de T.O. acompañadas de una lesión inflamatoria grave, a menudo consecuencia de la muerte del parásito, donde se puede demostrar una acción sintomática satisfactoria de los corticoides (SCAGLIA y col. 1.989). En cuanto a la corticoterapia local, la inyección de 40 mg de prednisona bajo la cápsula de Tenon, repetida a los 15 días, da buenos resultados (MOLK, 1.982-83; SHIELDS y col. 1.977). En general la cortisona inhibe la reacción inflamatoria y la producción de anticuerpos, disminuyendo el catabolismo del antígeno y favoreciendo su eliminación (FERNANDO, 1.960).

HAGLER (1.981) obtiene 15 estabilizaciones o mejorías por vitrectomía para 17 casos de T.O. tratados quirúrgicamente, que previamente habían fracasado con la corticoterapia. La utilización simultánea de un tratamiento antihelmíntico y la corticoterapia general y eventualmente local, es la conducta adoptada más frecuentemente. La vitrectomía debe hacerse en función de los resultados del tratamiento medicamentoso y del estado local del ojo.

MATERIAL Y METODOS

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- MATERIAL

3.1.1.- MATERIAL BIOLOGICO

3.1.1.1.- HELMINTOS ADULTOS

Los helmintos de T. canis se obtuvieron de perros infestados de forma natural, en su mayoría cachorros menores de seis meses, que los eliminaron de forma espontánea o tras la administración de un antihelmíntico adecuado (citrato de piperacina). Tras su identificación, los machos y las hembras, se lavaron varias veces con solución salina estéril al 0,85% y se conservaron en P.B.S. a 4°C hasta su uso.

3.1.1.2.- HUEVOS

Los huevos se obtuvieron a partir de heces de cachorros infestados, y principalmente del útero de hembras grávidas, tal y como se indica en los apartados de los métodos correspondientes.

3.1.1.3.- LARVAS DE T.canis

Las larvas se obtuvieron a partir de huevos embrionados en el laboratorio, en condiciones normalizadas, tras su posterior eclosión por procedimientos mecánicos.

3.1.1.4.- ANTIGENOS

Se utilizaron los siguientes tipos de antígeno: antígeno E/S, obtenido mediante cultivo "in vitro" de larvas de segundo estadio de T.canis.

antígeno total larvario, obtenido por sonicación de dichas larvas y antígeno "crudo" de adultos, obtenido a partir de extractos de los mismos.

3.1.1.5.- ANTICUERPOS MONOCLONALES

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales TC-1 y TC-2 (AGUILA y col., 1.988) obtenidos a partir de fluido ascítico de ratones BALB/c, inoculados vía I.P. con híbridos secretores de dichos anticuerpos monoclonales.

3.1.1.6.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION

3.1.1.6.1.- Ratones

Para las experiencias realizadas con ratones, se utilizaron animales de cepas consanguíneas, BALB/c y C57BL/10, seleccionando individuos de características uniformes. Se alojaron en camas de serrín, la alimentación se hizo a base de piensos y el suministro de agua con biberones.

3.1.1.6.2.- Conejos

Para las experiencias en conejos, se utilizaron conejos de laboratorio de la cepa Nueva Zelanda, los cuales se alojaron en jaulas individuales, alimentándolos con piensos y suministrándoles agua mediante un sistema de bebederos apropiado.

3.1.1.7.- SANGRE DE RATON

Para el recuento de eosinófilos se utilizó sangre de ratones BALB/c y C57BL/10 que habían sido inoculados con huevos embrionados de T. canis.

3.1.1.8.- SUEROS

3.1.1.8.1.- Sueros de ratón

Se emplearon sueros de ratones BALB/c y C57BL/10 inoculados con huevos embrionados de T. canis; sueros de ratones BALB/c inoculados con huevos embrionados del parásito y sometidos después a tratamiento con distintos preparados de mebendazol; y sueros de ratones BALB/c inoculados con antígeno E/S y antígeno total de adultos y posteriormente inoculados con huevos embrionados de T. canis. Como controles negativos se utilizaron sueros de ratones testigo sin inocular. Los sueros utilizados en todos los casos procedieron de la mezcla de sangre obtenida a partir de ratones de un mismo lote.

3.1.1.8.2.- Sueros de conejo

Se utilizaron sueros obtenidos a partir de conejos inoculados con el anticuerpo monoclonal TC-1, para estudios de la vida media de este anticuerpo "in vivo"; y sueros de conejos inmunizados con el anticuerpo monoclonal TC-1, sometido a tratamiento previo con pepsina, para la obtención de anticuerpos anti-idiotipo. Como controles negativos se utilizaron sueros de conejos testigo sin inocular.

3.1.2.- MATERIAL DE LABORATORIO

En este apartado citamos únicamente los instrumentos de laboratorio más peculiares, sobreentendiendo la disponibilidad del material existente normalmente en un laboratorio (material de vidrio, horno Pasteur, autoclave...).

- * Agitador incubador G 24 (New Brunswick Scientific).
- * Agitador de tubos (Selecta).
- * Baño de agua (Grant Instruments).
- * Batidora trituratora (Taurus).
- * Cámara Mac-Master.
- * Centrífuga (Selecta).
- * Centrífuga refrigerada (Beckman).
- * Centrífuga refrigerada (Heraeus Sepatech- Biofuge 17RS).
- * Contenedores de nitrógeno líquido.
- * Equipo para electroforesis vertical (Bio-Rad, Protean TM 16 cm).
- * Espectrofotómetro (Beckman).
- * Estereomicroscopio (Olympus).
- * Estufa (Climatest, S.A.).
- * Estufa (Selecta 247).
- * Estufa de CO₂ (Heraeus).
- * Flujo laminar (Telstar, S.A.).
- * Lector de E.L.I.S.A. (Multiskan D.C.).
- * Lupa (Olympus I.M.).
- * Material de plástico: Placas de Petri, tubos Falcon, tubos de tapón de rosca, tubos Eppendorf, etc.
- * Membranas de diálisis (Wisking tubing 24/32).
- * Membranas YM 10 (Amicon).
- * Microscopio invertido (Olympus I.M.).
- * Perlas de vidrio de 3 mm de diámetro.
- * Placa agitadora (Selecta).
- * Placas de E.L.I.S.A. (Costar, Dinotech).
- * Sistema de ultrafiltración por presión positiva (Amicon), modelos 8010 y 8050.
- * Sistema de ultrafiltración Centriprep 30 (Amicon).
- * Sonicator (Virsonic 50. The Virtis Company).
- * Tamiz diámetro de malla 0,012 m/m (Droquima).

- * Tamiz diámetro de malla 0,063 m/m (Droquima).
- * Viales de congelación celular (Nunc).

Todo el material de vidrio se esteriliza durante tres horas a 180°C en el horno Pasteur.

3.1.3.- SOLUCIONES Y REACTIVOS

* LIQUIDO DE BAILLENGER

Acetato de sodio cristalizado 15 g
 Acido acético glacial 3,6 ml
 H₂O destilada c.s.p. 1.000 ml
 Ajustar el pH a 5 con ácido acético.

* TAMPON FOSFATO SALINO (P.B.S.) 10 X

PO₄H₂Na.H₂O 2,5 g
 PO₄HNa₂.7H₂O 22,4 g
 Disolver aproximadamente en 500 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7,2-7,4.

Añadir:

ClNa 87,6 g
 Llevar a un volumen total de un litro. Diluir 1/10 antes de su uso resultando un tampón final: fosfato 0,01 M y ClNa 0,15 M.

* ETER ETILICO

* SOLUCION SALINA

ClNa 8,5 g
 H₂O destilada c.s.p. 1.000 ml

Esterilizar en autoclave y conservar a 4°C.

* SOLUCION SEMISATURADA DE SACAROSA

Sacarosa 200 g
H₂O destilada c.s.p. 500 ml

* SOLUCIONES DESINFECTANTES

Cloruro de benzalconio al 4%
Mertiolato al 0,1%

* HIDROXIDO SODICO NaOH 0.1N

* ANTIBIOTICOS Y ANTIFUNGICOS

Gentamicina (Llorente)
Nistatina (Micostatín - Squibb Industria Farmacéutica)

* LIQUIDO DECORTICANTE

Hipoclorito sódico al 2% 1 p
Hidróxido sódico al 2% 1 p

* H.B.S.S.

ClNa 8 g
ClK 0,4 g
Cl₂Ca 0,14 g
SO₄Mg.7H₂O 0,2 g
PO₄HNa₂.12H₂O 0,15 g
PO₄H₂K 0,06 g

Glucosa 1 g
 CO_3HNa 0,35 g
 H_2O destilada c.s.p. 1.000 ml
Disolver por separado Cl_2Ca y $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para evitar precipitaciones; esterilizar por filtración y conservar a 4°C.

* MEZCLA SULFOCROMICA

Dicromato potásico 10 g
 SO_4H_2 concentrado 200 ml
 H_2O destilada c.s.p. 1.000 ml

* SEPARADOR DE LINFOCITOS (Linfomatre)

* MEDIO MINIMO ESENCIAL DE EAGLE CON SALES DE EARLE (Cultek)

* GLUTAMINA

* n-HEXANO

* ALBUMINA SERICA BOVINA -B.S.A.- (Sigma)

* REACTIVO DE BRADFORD (Biorad)

* ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND (Biomérieux)

* ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND (Biomérieux)

* MEBENDAZOL COMERCIAL -LOMPER- (Laboratorios Esteve)

* MEBENDAZOL (Jansen)

* CARBOXIMETILCELULOSA SODICA

* POLIETILENGLICOL 6.000

* REACTIVOS PARA DIGESTION PEPSICA DE TEJIDOS

a) CITRATO SODICO al 0,25% en P.B.S.

$C_6H_5O_6Na_3 \cdot 2H_2O$ 2,5 g
P.B.S. c.s.p. 1.000 ml

b) LIQUIDO DE DIGESTION

Pepsina 1:10.000 (Sigma) 5 g
ClH concentrado 7 ml
ClNa 9 g
 H_2O destilada c.s.p. 1.000 ml
Resulta una solución al 0,5% de pepsina P/V; 0,7% de ClH V/V y 9%
de ClNa. Ajustar a pH 1,5.

c) REACTIVO DE FRENADO DE LA DIGESTION

NaOH 3N
NaOH 12 g
 H_2O destilada c.s.p. 100 ml

d) SOLUCION DE VERDE MALAQUITA

Verde malaquita 0,02 g
H₂O destilada c.s.p. 100 ml

* FORMOL

* REACTIVOS PARA TINCION DE FROTIS SANGUINEOS

a) ALCOHOL METILICO

b) SOLUCION DE GIEMSA

Giemsa 10 ml
H₂O destilada c.s.p. 100 ml

* MEDIO RPMI-1640 COMPLETO

Medio RPMI-1640 (Gibco)
L-glutamina 2 mM
Piruvato sódico 1 mM
Suero fetal bovino al 16%

* 2, 6, 10, 14 - TETRAMETIL-PENTADECANO -PRISTANE-

* ACIDO CAPRILICO -Acido octanoico- (Merck)

* TAMPON ACETATO 60 mM pH 4,00

Acido acético 3,44 ml
Diluir hasta 800 ml con H₂O destilada, añadir NaOH en lentejas hasta
pH 4 y completar hasta 1.000 ml con el mismo disolvente.

* SULFATO AMONICO SATURADO

Agregar 900 g de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ lentamente a 1.000 ml de H_2O destilada precalentada a 60°C y en agitación. Filtrar aún en caliente con papel de filtro y controlar que haya cristales en el fondo. Ajustar el pH a 7 con NH_4OH . Si pasa de 7 hay que restaurarlo con SO_4H_2 , nunca con ClH .

* BIOTINIL N-HIDROXISUCCINIMIDA (Sigma)

* CO_3HNa 0.1 M pH 8

CO_3HNa 8,4 g
 H_2O destilada c.s.p. 1.000 ml

* DIMETILSULFOXIDO

* TIMEROSAL

* GLICEROL

* REACTIVOS PARA E.L.I.S.A.

a) TAMPON CARBONATO 0,1 M

CO_3Na_2 3,2 g
 CO_3HNa 5,9 g
 H_2O destilada c.s.p. 1.000 ml
Ajustar el pH a 9,6 y conservar a 4°C .

b) P.B.S.-TWEEN 20

Tween 20 0,5 ml
P.B.S. c.s.p. 1.000 ml

c) SOLUCION DE POSTAPIZADO

B.S.A. 1 g
P.B.S.-Tween 20 c.s.p. 1.000 ml

d) CONJUGADOS (Dako-Atom)

Inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas totales de ratón
e inmunoglobulinas de cerdo anti-inmunoglobulinas totales de conejo
conjugadas con peroxidasa de rábano. Conservar en oscuridad a 4°C.

- CONJUGADOS (Tago)

Inmunoglobulinas de cabra anti-inmunoglobulinas totales de ratón sin
marcar, y conjugadas con peroxidasa de rábano; e inmunoglobulinas de
cabra anti-inmunoglobulinas totales de conejo conjugadas con peroxi-
dasa de rábano. Conservar en oscuridad a 4°C

Inmunoglobulinas de cabra anti-IgG de ratón e inmunoglobulinas de
cabra anti-IgM de ratón, conjugadas con peroxidasa de rábano.
Conservar a 4°C

e) TAMPON CITRATO-FOSFATO

A- Citrato 0,1 M

Acido cítrico 21 g
H₂O destilada c.s.p. 1.000 ml

B- Fosfato 0,2 M

Fosfato disódico hidratado 35,6 g
H₂O destilada c.s.p. 1.000 ml

TAMPON:

A 100 ml
B 100 ml
H₂O destilada c.s.p. 400 ml
Ajustar a pH 5

f) SUSTRATO

O-fenilenodiamina

O.P.D. 40 mg
Tampón citrato-fosfato 100 ml

Disolver el O.P.D. en aproximadamente 5 ml de tampón agitándolo. En el momento del uso añadir un 30% de H₂O₂ de 110 volúmenes a la solución de O.P.D. (4,3 ul de H₂O₂ para 10 ml de O.P.D.) que se ha de conservar congelado y en ausencia de luz.

g) REACTIVO DE FRENADO

SO₄H₂ 3N
SO₄H₂ 80 ml
H₂O destilada c.s.p. 500 ml

* REACTIVOS PARA LA DIGESTION PEPSICA DE INMUNOGLOBULINAS

a) PEPSINA (Sigma 3.200 U/mg)

b) TAMPON CITRATO 0,1 M pH 6

Acido cítrico 21 g

Disolver en H₂O destilada y desionizada y ajustar el pH a 6 con NaOH en lentejas. Llevar a un volumen final de 1.000 ml.

c) TAMPON CITRATO 0,1 M pH 3,5

Acido cítrico 21 g

Disolver en H₂O destilada y desionizada y ajustar el pH a 3,5 con NaOH en lentejas. Llevar a un volumen final de 1.000 ml.

d) TAMPON CITRATO 1 M pH 3,5

Acido cítrico 105,07 g
Disolver en H₂O destilada y desionizada y ajustar el pH a 3,5 con NaOH en lentejas. Llevar a un volúmen final de 500 ml.

e) TAMPON TRIS 3 M pH 8

Tris base (Hidroximetilenamino metano) 363,42 g
H₂O destilada c.s.p. 1.000 ml

* REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE

a) SOLUCION DE ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA

Acrilamida 75 g
Bisacrilamida 2 g
H₂O destilada c.s.p. 250 ml
Filtrar antes de utilizar.

b) TAMPON DEL GEL DE CONCENTRACION

Tris base (hidroximetilenaminometano) 15,14 g
H₂O destilada c.s.p. 200 ml
Ajustar el pH con ClH 1 N a 6,8 y llevar a 250 ml con H₂O destilada.

c) TAMPON DEL GEL DE RESOLUCION

Tris base (hidroximetilenaminometano) 90,83 g
H₂O destilada c.s.p. 200 ml
Ajustar con ClH a pH 8,8 y llevar a 250 ml con H₂O destilada.

d) TAMPON DE CUBETA

Tris base (hidroximetilenaminometano) 75,69 g
SDS (dodecilsulfatosódico) 25 g
Glicina 360 g

H₂O destilada c.s.p. 2.500 ml

e) TAMPON DE LA MUESTRA

Tris base (hidroximetilaminometano) 0,757 g

Glicerol 10 g

SDS (dodecilsulfatosódico) 2,3 g

H₂O destilada c.s.p. 80 ml

Ajustar a pH 6,8 y llevar a 100 ml con H₂O destilada.

Filtrar por papel Whatman nº1.

f) AZUL DE BROMOFENOL

g) 2-MERCAPTOETANOL

h) GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)

Se adjunta tabla para la preparación de los mismos según método de LAEMMLI (LAEMMLI, 1.970), página 179

i) SOLUCION DE TINCIÓN PARA SDS-PAGE

Azul de Coomassie al 0,1% en ácido tricloroacético al 30%.

j) SOLUCION DE ACLARADO PARA SDS-PAGE

Acido acético al 7% en H₂O destilada.

i) MARCADORES DE P _m PARA SDS-PAGE	<u>P_m</u>
Lactoalbúmina	14.200 D
Inhibidor de tripsina (Soybean)	20.100 D
Tripsinógeno	24.000 D
Anhidrasa carbónica	29.000 D
Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa ...	36.000 D
Ovoalbúmina	45.000 D
Albúmina bovina	66.000 D
Fosforilasa B	97.400 D
B-Galactosidasa	116.000 D

* ULTRAGEL ACA-44

* AZIDA SODICA

* SEPHAROSA 4B ACTIVADA CON BROMURO DE CIANOGENO (Pharmacia)

* PROTEINA A-SEPHAROSA 4B (Pharmacia)

* REACTIVOS PARA COLUMNAS DE AFINIDAD

a) ClH 1mM

ClH concentrado 10,82 ul

H₂O destilada c.s.p. 100 ml

b) TAMPÓN DE ACOPLAMIENTO pH 8,3

CO₃HNa 0,1 M/ClNa 0,5 M

CO₃HNa 8,401 g

ClNa 29,22 g

H₂O destilada c.s.p. 1.000 ml

c) TAMPÓN BLOQUEANTE DE GRUPOS ACTIVOS

Glicina 0,2 M pH 8

Glicina 300,3 mg

Tampón de acoplamiento 20 ml

d) TAMPÓN LAVADOR

Acetato 0,1 M/ClNa 0,5 M pH 4

Acetato anhidro 16,4 g

Acido acético 11,4 ml

ClNa 29,2 g

H₂O destilada c.s.p. 1.000 ml

e) P.B.S.-AZIDA 0,02%

Azida sódica 0,02 g

P.B.S. c.s.p. 100 ml

f) GLICINA CLORHIDRICA

Glicina 0,05 M/ClNa 0,15 M pH 2,3

ClNa 8,76 g

Glicina 3,77 g

Azida sódica 0,2 g

Disolver en 800 ml de H₂O destilada y llevar a pH 2,3 con ClH o NaOH. Añadir 0,2 g de azida sódica y completar hasta 1.000 ml.

g) TAMPON T.B.S. pH 8,6

Tris 0,05 M - ClNa 0,1 M pH 8,6

Tris base (hidroximetilenaminometano) 6,057 g

ClNa 8,76 g

Azida sódica 0,2 g

Disolver en 800 ml de H₂O destilada y dejar dos horas agitándose. Añadir ClH hasta pH 8,6 y mantener a temperatura ambiente 24-48 horas. Volver a ajustar el pH a 8,6 y completar hasta 1.000 ml con H₂O destilada.

h) TAMPON TRIS-ClH 3 M pH 7

Tris base (Hidroximetilenaminometano) 363,42 g

Añadir ClH hasta pH 7 y completar con H₂O destilada hasta 1.000 ml.

* ESTREPTAVIDINA - PEROXIDASA (Sigma)

PROTOCOLO DE PREPARACION DE GELES PARA SDS-PAGE (Laemmli)

Gel de concentración				Gel de resolución								
Volumen final	5 ml	10 ml	20 ml	10 ml	20 ml	30 ml	10 ml	20 ml	30 ml	10 ml	20 ml	30 ml
Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)	0,625	1,250	2,500	2,500	5,000	7,500	3,333	6,666	10,000	4,166	8,333	12,500
Tampón del gel de concentración (0,5 M)	1,250	2,500	5,000									
Tampón del gel de resolución (3 M)				1,250	2,500	3,750	1,250	2,500	3,750	1,250	2,500	3,750
Solución de 10% SDS	0,050	0,100	0,200	0,100	0,200	0,300	0,100	0,200	0,300	0,100	0,200	0,300
H ₂ O destilada	2,825	5,650	11,300	5,650	11,300	16,950	4,817	9,633	14,450	3,983	7,967	11,950
Persulfato amónico al 1,5% (60 mg/4ml)	0,250	0,500	1,000	0,500	1,000	1,500	0,500	1,000	1,500	0,500	1,000	1,500
TEMED (*)	0,004	0,008	0,015	0,004	0,008	0,015	0,004	0,008	0,015	0,004	0,008	0,015
Concentración final de acrilamida	3,75%			7,5%			10%			12,5%		

(*) N,N,N',N' - Tetrametilenodiamina

3.2.- MÉTODOS

3.2.1.- OBTENCION DE HUEVOS

Los huevos se obtuvieron de cachorros infestados de forma natural o bien del útero de hembras grávidas adultas. Según la procedencia y antes del embrionamiento, se sometieron a tratamientos diferentes.

3.2.1.1.- A PARTIR DE HECES

Las heces positivas en exámen coprológico, se concentraron mediante distintos procedimientos:

3.2.1.1.1.- Método de Bailenger (BAILENGER, 1.982)

- a) - Diluir la muestra en 10 veces su volumen de solución tampón.
- b) - Dejar sedimentar (menos de un minuto).
- c) - Tamizar a través de doble gasa y recoger el filtrado en tubos de centrífuga.
- d) - Añadir éter etílico en igual volumen (5/5 ml).
- e) - Emulsionar agitando vigorosamente.
- f) - Centrifugar a 1.500 r.p.m. de uno a tres minutos.
- g) - Decantar (los huevos quedan en el sedimento).
- h) - Lavar el sedimento tres veces con solución salina estéril.

3.2.1.1.2.- Gradiente constante de sacarosa

- a) - Diluir las heces en solución salina.
- b) - Preparar una solución semisaturada de sacarosa y añadir unas gotas de mertiolato como conservador.
- c) - Poner 5 ml de la solución a concentrar en el fondo del tubo de centrífuga.
- d) - Con una jeringa y su aguja, inocular 5 ml de la solución semisaturada de sacarosa, bajo la suspensión de la muestra. Esta operación debe realizarse muy lentamente para obtener un sistema bifásico con interfase nítida.
- e) - Centrifugar a 2.000 r.p.m., durante cinco minutos.
- f) - Recoger los huevos de la interfase.
- g) - Lavar tres veces con solución salina fisiológica.

3.2.1.1.3.- Concentración mixta Bailenger-sacarosa

Con la utilización conjunta de los dos métodos, se consigue una solución de huevos más limpia, al eliminar todos los restos de heces que pudieran haber quedado tras la concentración por Bailenger. Consiste en tratar los huevos que quedan en el sedimento por el método de Bailenger, con la solución semisaturada de sacarosa.

3.2.1.2.- A PARTIR DE HEMBRAS GRAVIDAS

Las hembras se lavaron varias veces con solución salina estéril. A continuación se sometieron a histerectomía en un microscopio de disección. Los huevos se extrajeron cuidadosamente de las porciones maduras del útero, procurando no extraer huevos infértiles. Después se lavaron con hidróxido sódico 0,1 N para recoger los que hubieran quedado adheridos a las paredes.

Los huevos se filtraron por doble gasa, para eliminar los restos de útero y se concentraron por centrifugación a 1.500 r.p.m. durante cinco minutos, lavándose posteriormente con solución salina estéril.

3.2.2.- EMBRIONAMIENTO DE HUEVOS

Tanto los huevos obtenidos de heces como los procedentes de hembras grávidas, se sometieron a la misma pauta.

Una vez limpios, se lavaron cinco veces con solución salina estéril al 0,85%. Después se sometieron a la acción de cloruro de benzalconio al 4% durante 15 minutos, o mertiolato el mismo tiempo, con objeto de eliminar las posibles bacterias y esporas de hongos. A continuación se lavaron otras cinco veces con solución salina estéril y se dispusieron en placa de Petri, utilizando como medio de embrionamiento, solución salina estéril al 0,85% (unos 20 ml por placa).

Se añadieron unos 200.000 huevos por placa y se incubaron a 37°C en estufa, bajo las condiciones adecuadas (acción del ciclo luminoso natural, GUILLEN y col. 1.986, b) y oxigenación del medio mediante agitación periódica. Añadimos al medio aproximadamente cuatro gotas de gentamicina al 0,4% y la misma cantidad de nistatina para evitar posteriores contaminaciones. El tiempo de embrionamiento necesario en estas condiciones es de 32 días (GUILLEN y col. 1.986, b).

3.2.3.- OBTENCION DE LARVAS

Una vez que los huevos alcanzaron el estadio infestante, se provocó la eclosión por un método mecánico, ya que los huevos de T.canis son incapaces de eclosionar de forma espontánea.

3.2.3.1.- ECLOSION DE HUEVOS EMBRIONADOS MEDIANTE PERLAS DE VIDRIO

Los huevos embrionados con larvas de segundo estadio en su interior, se lavaron tres veces con solución salina estéril al 0.85%. Se eliminó el sobrenadante y se trató con una mezcla a partes iguales de hipoclorito sódico al 2% e hidróxido sódico al 2%, en agitación constante a 37°C durante 40 minutos, eliminándose, de esta forma, la cubierta externa.

Inmediatamente después se lavaron de nuevo cinco veces con solución salina estéril al 0,85%, mediante centrifugación a 1.500 r.p.m. durante cinco minutos, para eliminar los restos de la mezcla decorticante. A continuación se resuspendieron en H.B.S.S. estéril con perlas de vidrio estériles de 3 mm de diámetro en agitación rotatoria, a temperatura ambiente, durante 30 minutos para que se produjera la eclosión.

3.2.3.2.- SEPARACION DE LARVAS VIABLES

3.2.3.2.1.- Purificación de larvas mediante solución semisaturada de sacarosa

Se ensayó el método tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado de concentración y limpieza de huevos procedentes de heces.

Las larvas vivas se recogieron en el sedimento, mientras que los huevos sin embrionar, los no eclosionados, y las larvas muertas quedaron en la interfase. El sedimento donde se encontraban las larvas vivas se lavó con H.B.S.S. para eliminar los restos de sacarosa.

3.2.3.2.2.- Purificación de larvas mediante separador de linfocitos

- a) - Añadir cuidadosamente con la ayuda de una pipeta Pasteur, 4 ml de H.B.S.S. con las larvas recién eclosionadas, sobre 3 ml de separador de linfocitos en un tubo de centrífuga de 10 ml, evitando la mezcla entre el H.B.S.S. y el separador de

linfocitos.

- b) - Inmediatamente centrifugar a 1.500 r.p.m. durante 30 minutos, con lo que las larvas móviles quedarán en el sedimento, mientras que los huevos infértiles o no eclosionados, y las larvas muertas, permanecerán en la interfase.
- c) - Lavar las larvas recogidas del sedimento con H.B.S.S. estéril para eliminar los restos de reactivo.

3.2.4.- CULTIVO DE LARVAS " IN VITRO "

Se utilizó el medio mínimo esencial de Eagle con sales de Earle, suplementado con L-glutamina 2mM, al cual se añadió 5-fluoro-citosina al 0,01% y gentamicina al 0,4% para evitar contaminaciones micóticas y bacterianas. Los cultivos se mantuvieron en estufa a una temperatura de 37°C.

3.2.5.- OBTENCION DE ANTIGENOS

3.2.5.1.- OBTENCION DE ANTIGENO EXCRETOR-SECRETOR LARVARIO

- a) - Lavar cinco veces en H.B.S.S. estéril las larvas obtenidas tras la eclosión de huevos.
- b) - Poner las larvas a cultivar, en tubos estériles de tapón de rosca, en el medio de cultivo citado anteriormente, poniendo en cada tubo 5 ml de medio a una concentración de 1×10^4 larvas/ml, incubándolas en estufa a 37°C.
- c) - Examinar semanalmente la contaminación y mortalidad de los tubos.
- d) - Desechar los tubos que muestran contaminación y en los que la mortalidad exceda del 5%.

- e) - En los tubos satisfactorios, sedimentar las larvas por centrifugación a 1.500 r.p.m. durante 10 minutos y aspirar el medio asépticamente (en campana de flujo laminar).
- f) - Reemplazar igual volumen de medio estéril en los tubos y devolvérlos a la estufa.
- g) - Dializar el medio recogido frente a P.B.S., a 40C, y en placa agitadora.
- h) - Valorar el contenido proteico del dializado.
- i) - Fraccionar y congelar.

3.2.5.2.- OBTENCION DE ANTIGENO TOTAL LARVARIO

Para la obtención de antígeno total larvario, se partió de una suspensión de larvas de T. canis en P.B.S., sometiéndola a sonicación. La suspensión larvaria se procesó manteniéndola en hielo y sometiéndola a varios ciclos de sonicación, hasta que microscópicamente pudo comprobarse la total desintegración de las mismas. A continuación se dializó del modo descrito anteriormente, valorando después el contenido proteico y congelándolo hasta su uso.

3.2.5.3.- OBTENCION DE ANTIGENO TOTAL DE ADULTOS

- a) - Lavar varias veces los helmintos en solución fisiológica.
- b) - Fragmentar en mortero.
- c) - Homogeneizar hasta obtener una pasta.
- d) - Extraer durante toda la noche a 40C en P.B.S..

- e) - Dispersar la pasta en 7 ml de P.B.S. y delipidar con 3 ml de n-hexano, mediante agitación enérgica y decantación de la fase superior.
- f) - Centrifugar a 10.000 r.p.m. a 4°C durante 30 minutos y recoger el sobrenadante como antígeno "crudo".
- g) - Valorar la concentración de proteínas.
- h) - Fraccionar y congelar.

3.2.6.- CONCENTRACION DE ANTIGENO EXCRETOR-SECRETOR LARVARIO

El antígeno E/S se concentró por presión positiva. Se utilizó el sistema de ultrafiltración AMICON y los filtros YM 10, procesando el antígeno de la siguiente manera:

- a) - Mantener los filtros, si son nuevos, en solución salina por espacio de 30 minutos, o bien, si estaban ya en solución de mantenimiento, lavar simplemente.
- b) - Montar el sistema de ultrafiltración y añadir la solución de antígeno a concentrar.
- c) - Aplicar presión positiva.
- d) - Poner en marcha el sistema de agitación, cuidando que el flujo de salida sea lento y concentrar hasta obtener el volumen deseado.
- e) - Valorar la concentración de proteínas.

3.2.7.- DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINAS: METODO DE BRADFORD

3.2.7.1.- MICROENSAYO

Para valorar el antígeno E/S de T.canis, se utilizó el microensayo de Bradford, capaz de detectar entre 1 y 25 ug/ml de proteína.

- a) - Preparar una curva patrón de B.S.A., con distintas concentraciones de la proteína estándar (1-25 ug/ml).
- b) - Añadir 0,8 ml de la dilución correspondiente de proteínas, en tubos secos. En el control blanco, añadimos 0,8 ml de P.B.S..
- c) - Añadir 0,2 ml del reactivo de Bradford concentrado.
- d) - Mezclar suavemente por inversión, evitando el exceso de espuma.
- e) - Tras un periodo de incubación de cinco minutos a una hora como máximo, medir la D.O. a 595 nm frente al blanco.
- f) - Representar la D.O. a 595 nm frente a la concentración de proteínas y extrapolar la concentración desconocida mediante recta de regresión lineal.
- g) - Fraccionar y congelar hasta su uso.

3.2.7.2.- MACROENSAYO

Para valorar el contenido proteico del antígeno total larvario y del extracto utilizado como antígeno "crudo" de T. canis, se empleó el macroensayo de Bradford, que permite detectar entre 200 y 1.400 ug/ml de proteína.

- a) - Preparar una curva patrón de B.S.A., con distintas concentraciones de la proteína estándar (200-1.400 ug/ml).

- b) - Añadir 0,1 ml de la dilución correspondiente de proteínas, en tubos secos. En el control blanco, añadimos 0,1 ml de P.B.S..
- c) - Añadir 5 ml del reactivo de Bradford convenientemente diluido. (En el macroensayo, el reactivo de Bradford concentrado, debe diluirse con cuatro volúmenes de agua destilada y desionizada, y filtrarse a través de papel Whatman nº1).
- d)- Proceder del modo indicado en los puntos d), e), f), y g) del apartado anterior.

3.2.8.- PAUTAS DE INOCULACION

3.2.8.1.- PAUTAS DE INOCULACION EN RATONES

3.2.8.1.1.- Inoculación con huevos embrionados

El inóculo de huevos de T.canis se preparó a partir de las muestras obtenidas de huevos embrionados en el laboratorio. Para que el inóculo fuera lo más homogéneo posible, se hizo una muestra única. Se realizó un recuento de huevos embrionados que contenían larvas de segundo estadio en su interior, usándose para ello una cámara Mc-Master. Una vez hechos varios recuentos, se calculó la media, que multiplicada por el factor 6,66 nos da el número de huevos embrionados/ml. Se resuspendieron en el volumen adecuado de solución salina al 0,85% para obtener la dosis apropiada y se administró el inóculo (0,5 ml) mediante sonda buco-gástrica.

3.2.8.1.2.- Inoculación con antígeno total de adultos

En las pruebas de protección con antígenos, realizadas en ratones BALB/c, se empleó la siguiente pauta de inoculación para el antígeno total de adultos:

El antígeno se administró por vía I.M. en la pata trasera, emulsionado a partes iguales en adyuvante completo de Freund, con una concentración de 1 mg/ml en volumen final. La inmunización se repitió semanalmente hasta un total de tres inyecciones. En las dos primeras inmunizaciones, cada ratón recibió 1 ml de la emulsión de antígeno (1 mg/proteína/inyección) y en la última recibió 1 ml del antígeno a la misma concentración que en las dos anteriores más 1 ml conteniendo 1,25 mg de proteína. La cantidad final de antígeno total de adultos administrado por ratón fue de 4,25 mg. Pasadas dos semanas tras la última inyección, los ratones se inocularon por V.O. con 1.000 huevos embrionados y se sacrificaron a las tres semanas siguientes (Esquema I). Los animales se sangraron semanalmente del seno venoso retroorbital del modo descrito en el apartado 3.2.12..

3.2.8.1.3.- Inoculación con antígeno excretor-secretor larvario

El antígeno E/S se administró por la misma vía y con la misma pauta que el antígeno total de adultos, realizándose el inóculo de huevos y el sacrificio de los animales a los tiempos señalados (Esquema I). El antígeno se administró emulsionado a partes iguales en adyuvante completo de Freund, con una concentración proteica de 7,5 ug/ml en volumen final. Cada ratón recibió 0,5 ml del antígeno así emulsionado (3,75 ug/proteína/inyección). Los animales se sangraron semanalmente del seno venoso retroorbital, según el método descrito en el apartado 3.2.12..

Esquema I

Pauta de inmunización y sangrado

Día 0	1ª Dosis I.M. y Sangrado
1ª sem. p.i.	2ª Dosis I.M. y Sangrado
2ª sem. p.i.	3ª Dosis I.M. y Sangrado
3ª sem. p.i.	Sangrado
4ª sem. p.i.	Sangrado
5ª sem. p.i.	Huevos V.O. y Sangrado
6ª sem. p.i.	Sangrado
7ª sem. p.i.	Sangrado
8ª sem. p.i.	Sacrificio y Sangrado

sem. p.i.= semana postinmunización

I.M.= intramuscular

V.O.= vía oral

3.2.8.1.4.- Inoculación con el anticuerpo monoclonal TC-1

Para el estudio de protección pasiva en ratones BALB/c, se utilizó el anticuerpo monoclonal TC-1 a una concentración de 4,88 mg/ml, administrándolo a una dilución en P.B.S. de 1/128 (38,12 ug/ml). Cada ratón recibió una dosis de 0,4 ml de esta concentración por vía I.P., lo que corresponde a 15,24 ug/inyección.

Los animales se dividieron en tres lotes: el lote B1 recibió sólo los huevos embrionados de T. canis por V.O., el lote B2 recibió el anticuerpo monoclonal 24 horas antes de la inoculación de los huevos y el lote B3 recibió simultáneamente los huevos por V.O. y el anticuerpo monoclonal por vía I.P..

3.2.8.2.- INOCULACION A CONEJOS CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1

Se utilizaron dos conejos para el estudio de la vida media del anticuerpo monoclonal TC-1. Una vez extraída muestra de sangre para obtención de suero control negativo, se inocularon por vía I.V. en la vena marginal de la oreja. Cada conejo recibió 0,53 ml del anticuerpo monoclonal en P.B.S. a una concentración de 4,88 mg/ml, sangrándolos durante 14 días y utilizando alternativamente un conejo cada día, (conejo I los días impares y conejo II los días pares). Por último se realizó una extracción el día 20 p.i..

3.2.9.- PAUTAS DE TRATAMIENTO A RATONES CON MEBENDAZOL

Para las experiencias de tratamiento con mebendazol, se utilizaron siete lotes de 12 ratones BALB/c, a los que se administraron 1.000 huevos embrionados de T. canis por ratón, V.O. y a los que posteriormente se suministró el tratamiento, reservando uno de ellos como control sin tratar. Los lotes se describen a continuación:

- Lote I: Control.
- Lote II: 100 mg/kg/día de mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa sódica al 1%.
- Lote III: 100 mg/kg/día de mebendazol en carboximetilcelulosa sódica al 1%.
- Lote IV: 100 mg/kg/día de mebendazol en agua.
- Lote V: 100 mg/kg/día de mebendazol como dispersión sólida al 10% en

polietilénglicol 6.000, disuelto en agua.

- Lote VI: 50 mg/kg/día de mebendazol al 10% en polietilénglicol 6.000 disuelto en agua.
- Lote VII: 25 mg/kg/día de mebendazol al 10% en polietilénglicol 6.000 disuelto en agua.

El producto se administró V.O. mediante sonda buco-gástrica en 0,5 ml de vehículo. Cada uno de los lotes se subdividió en lote "a" y lote "b" de seis ratones cada uno con los que se realizaron dos experiencias paralelas.

En la primera, el agente a ensayar se administró durante los tres primeros días p.i., momento en el que la población larvaria hepática es elevada, sacrificando los animales a la primera semana p.i., momento en que muy pocas larvas permanecen en esta localización. (Lotes Ia -control-, IIa, IIIa, IVa, Va, VIa y VIIa).

En la segunda experiencia, el tratamiento se administró durante los días 4, 5 y 6 p.i. por haberse comprobado previamente la presencia de un número elevado de larvas en la canal siendo escaso en cerebro, sacrificando los animales a las siete semanas p.i., cuando la cantidad de larvas en cerebro resulta ya ser elevada en condiciones normales. (Lotes Ib -control-, IIb, IIIb, IVb, Vb, VIb y VIIb). En esta caso los ratones se sangraron semanalmente hasta su sacrificio.

3.2.10.- RECUPERACION LARVARIA A PARTIR DE TEJIDOS

En la experiencia del estudio de la migración de T. canis por recuperación larvaria, (apartado 4.1.1.), los ratones se infestaron mediante inoculación por el procedimiento anteriormente descrito (3.2.8.1.1), sacrificándose los siguientes días: 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 21, 35, 49 y 63 p.i.. Cada uno de estos días se sacrificaron seis ratones de la cepa BALB/c y seis ratones de la cepa C57BL/10. Hay que señalar que los ratones sacrificados los días 2, 5, 7, 10, 15, 21 y 63 p.i. habían sido inoculados con un lote de huevos y los sacrificados los días 3, 4, 35 y 49 se infestaron con huevos procedentes de un cultivo diferente.

El método utilizado para la recuperación de las larvas de T.canis corresponde básicamente a una modificación del modelo de ABDEL-HAMEED (1.984). Podemos distinguir varias fases: disección, homogeneización, digestión, tamizado y recuento larvario.

3.2.10.1.- DISECCION

- a) - Sacrificar los ratones por dislocación cervical y sujetar el animal clavándolo en un corcho de disección.
- b) - Retirar la piel por doble tracción a partir de un ojal dorsal, abriendo la cavidad abdominal a través de los plexos musculares.
- c) - Extraer hígado, bazo y riñones.
- d) - Efectuando un corte a nivel del esternón y separando ambos lados de la caja torácica, extraer pulmones y corazón.
- e) - Retirar toda la piel del animal, y eliminar el rabo.
- f) - Tomar la mitad de la canal y la pata trasera derecha.
- g) - Extraer el cerebro a partir de dos cortes longitudinales en el cráneo.

Cada órgano se colocó por separado en una placa de Petri y se cubrió con 25 ml de solución de citrato sódico al 0,25% en P.B.S.. El cerebro se dividió en pequeñas porciones, que se aplastaron entre dos portas y se contaron las larvas al microscopio.

3.2.10.2.- HOMOGENEIZACION

- a) - Picar cada órgano por separado con tijeras en placa de Petri con citrato sódico al 0,25% en P.B.S..
- b) - Colocar el contenido de cada placa en el vaso de una batidora

tritadora, completando el volumen hasta 50 ml. (100 ml para la canal) con solución de citrato sódico al 0.25% en P.B.S..

- c) - Triturar a 17.000 r.p.m. durante 8-10 segundos en el caso de pulmones, hígado y vísceras (bazo, riñones y corazón) y durante 12-15 segundos en el caso de músculo de la pata y canal.

3.2.10.3.- DIGESTION

- a) - Añadir al homogeneizado de cada tejido igual volumen del líquido de digestión.
- b) - Digerir en agitación rotatoria a 200 r.p.m. y 37°C, durante 10-15 minutos hígado, pulmones y vísceras, y durante 20-30 minutos músculo de la pata y canal.
- c) - Frenar la reacción de digestión mediante la adición de 1,25 ml de NaOH 3N (2,5 ml para la canal), con objeto de neutralizar el pH, y de que la pepsina-clorhídrica no siga actuando.

3.2.10.4.- TAMIZADO

- a) - Tamizar a través de un sistema formado por dos tamices de nylon cuyos diámetros de malla son 0,063 m/m (tamiz superior) y 0,012 m/m (tamiz inferior). En el tamiz superior quedan retenidos los restos de tejido sin digerir y en el inferior quedan retenidas las larvas.
- b) - Recoger las larvas del tamiz inferior, intentando arrastrar bien con el mínimo volumen de agua.
- c) - Recoger la suspensión de larvas, correspondiente a cada órgano, por separado en un tubo de centrifuga de 50 ml.

3.2.10.5.- RECUENTO LARVARIO

- a) - Añadir al contenido de cada tubo que contiene el resultado del tamizado, unas dos o tres gotas de solución de verde malaquita, agitando para que el colorante se distribuya homogéneamente.
- b) - Disponer la suspensión en una placa de Petri rayada, y efectuar el recuento en un microscopio invertido.
- c) - El número de larvas contadas del músculo de la pata trasera y de la canal, se multiplica por dos como factor de corrección, puesto que sólo se digiere una de las patas traseras y la mitad de la canal.

3.2.11.- INVESTIGACION DE LARVAS EN LA CAVIDAD PERITONEAL

Dos ratones de la cepa BALB/c y dos de la cepa C57BL/10, inoculados con 1.000 huevos embrionados de T.canis V.O., se sacrificaron los días 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 21, 35, 49 y 63 p.i. y se investigó la posible presencia de larvas en su cavidad peritoneal. Para ello se siguió el método utilizado por BARRIGA y MYSER (1.987) que, básicamente, consiste en:

- a) - Sacrificar el animal y abrir a nivel de la cavidad abdominal.
- b) - Lavar la cavidad peritoneal tres veces con ayuda de una jeringa con solución salina estéril.
- c) - Recoger en tubos, a los que se añade el mismo volumen de formol al 10%.
- d) - Centrifugar a 500 xg durante cinco minutos.
- e) - Añadir una gota de solución de verde malaquita al sedimento y buscar las larvas al microscopio.

3.2.12.- OBTENCION DE SANGRE Y SUEROS

En ratones, para obtener mayor cantidad de sangre, se siguió la técnica de Nöller, tomando la sangre de la porción del seno venoso retroorbital. Con este método se consigue recoger de 0,5 a 1 ml de sangre por animal.

Después de pasado un tiempo y formado el coágulo (20-30 minutos), la sangre se centrifugó a 3.500 r.p.m. durante 30 minutos. Se recogió el suero, se fraccionó y se congeló hasta su uso.

En conejos, los sangrados se realizaron tomando la sangre de la vena marginal de la oreja y para la obtención de sueros, la sangre se procesó como se ha indicado anteriormente.

3.2.13.- RECUENTO DE EOSINOFILOS

Para el recuento de eosinófilos, procesamos la sangre de ratones BALB/c y C57BL/10 que habían sido inoculados con huevos embrionados de T. canis, en el estudio de la migración larvaria en tejidos.

- a) - Hacer los frotis de sangre sobre portas previamente desengrasados con alcohol-éter.
- b) - Una vez secos, fijar introduciendo en alcohol metílico durante cinco minutos.
- c) - Teñir con Giemsa durante 10 minutos.
- d) - Lavar con agua destilada.
- e) - Dejar secar, añadir una gota de aceite de cedro y observar al microscopio con objetivo de inmersión.
- f) - Contar el número de eosinófilos por cada 100 leucocitos.

3.2.14.- PREPARACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales TC-1 y TC-2 se prepararon a partir de los hibridomas secretores (AGUILA y col., 1.988) que se habían mantenido congelados en nitrógeno líquido.

3.2.14.1.- DESCONGELACION DE CELULAS

- a) - Preparar en un tubo para cultivo de tejidos, aproximadamente 9 ml de medio RPMI-1640 completo y conectar el baño de agua.
- b) - Sacar el vial a descongelar del nitrógeno líquido.
- c) - Descongelarlo introduciéndolo en un baño de agua a 37°C. Cuando sólo quede un cristal de hielo de unos 3 mm, sacar el vial del baño y limpiarlo exteriormente.
- d) - Recoger el contenido del vial con una pipeta de 1 ml y pasarlo al tubo preparado con el RPMI-1640 completo.
- e) - Centrifugar durante 10 minutos a 1.000 r.p.m. y 20°C.
- f) - Eliminar el sobrenadante aspirándolo con una pipeta Pasteur conectada al vacío.
- g) - Resuspender en el volumen necesario de RPMI-1640 completo para que las células alcancen la fase exponencial de crecimiento.

3.2.14.2.- MANTENIMIENTO DEL HIBRIDOMA

Los hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales se mantuvieron en crecimiento exponencial en medio RPMI-1640 completo, utilizando botellas de cultivo T-75. Se mantuvieron a 37°C en estufa con un 7% de CO₂, durante el tiempo necesario para obtener el número de células a inocular a los ratones.

3.2.14.3.- PRODUCCION DE ASCITIS

Para la producción de líquido ascítico se inocularon ratones de la cepa BALB/c histocompatibles con los híbridos.

- a) - Inocular por vía I.P. 0,5 ml de Pristane por ratón y dejar transcurrir unos 10 días.
- b) - Administrar por la misma vía $1-2 \times 10^6$ células de híbrido por ratón.
- c) - Una vez producida la ascitis, extraerla periódicamente mediante punción I.P..
- d) - Centrifugar para eliminar restos, recoger el sobrenadante y almacenar congelado.

3.2.15.- PURIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS

Para la purificación de inmunoglobulinas, bien procedentes de ascitis, bien de sueros, se utilizó una precipitación con ácido caprílico combinada con una precipitación con sulfato amónico.

3.2.15.1.- PRECIPITACION CON ACIDO CAPRILICO

- a) - Medir el volumen de ascitis o suero a procesar.
- b) - Diluir en proporción 1:3 con tampón acetato 60 mM pH 4.
- c) - Ajustar el pH a 4,8 y dejar 30 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- d) - Medir la cantidad de ácido caprílico necesario: 1,1 ml para cada 100 ml de la dilución 1:3 de ascitis o suero en tampón acetato 60 mM pH 4.

- e) - Añadir el ácido caprílico muy lentamente, en agitación vigorosa y dejar 30 minutos en incubación a temperatura ambiente y con la misma agitación.
- f) - Centrifugar a 4°C y a 10.000 xg, durante 30 minutos.
- g) - Recuperar el sobrenadante y filtrarlo por membrana de celulosa. Mantener en hielo durante este proceso, pues el ácido caprílico puede precipitar. El filtrado ha de ser transparente.
- h) - Neutralizar el pH a 7,2-7,4.
- i) - Medir la D.O. del filtrado a 280 nm.

3.2.15.2.- PRECIPITACION CON SULFATO AMONICO

- a) - Preparar una solución de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ saturado en agua destilada.
- b) - Poner en agitación el filtrado anterior sin hacer espuma y añadir gota a gota el mismo volumen de la solución de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ saturado, a temperatura ambiente.
- c) - Dejar en agitación de 20 a 30 minutos para que precipiten las inmunoglobulinas.
- d) - Centrifugar a 4°C y a 10.000 xg, durante 30 minutos.
- e) - Eliminar el sobrenadante y añadir al sedimento $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 50% de saturación. (Añadir la mitad del volumen que había antes de la centrifugación, para obtener el mismo volumen inicial).
- f) - Conservar a 4°C.
- g) - En el momento de su uso, centrifugar a 3.000 r.p.m. y a 4°C, durante 20 minutos.
- h) - Resuspender el sedimento en P.B.S., pH 7,4, con el volumen

adecuado.

- i) - Dializar frente a P.B.S., pH 7,4, a 4°C durante toda la noche.

3.2.16.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE INMUNOGLOBULINAS

- a) - Medir la D.O. de las inmunoglobulinas, diluidas en P.B.S., a 280 nm.
- b) - Dividir la D.O. del problema entre el factor 1,4 en el caso de suero de ratón (una concentración de 1 mg de inmunoglobulina de ratón/ml presenta una D.O. de 1,4) y entre el factor 1,38 en el caso de suero de conejo (una concentración de 1 mg de inmunoglobulina de conejo/ml presenta una D.O. de 1,38) para obtener la concentración de inmunoglobulina/ml.

3.2.17.- CONJUGACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1 CON BIOTINA

- a) - Dializar el TC-1, purificado por precipitación con ácido caprílico y sulfato amónico saturado, a 1 mg/ml, frente a CO_3HNa 0,1 M pH 8 durante 24 horas con tres cambios de esta solución.
- b) - Calentar a temperatura ambiente la biotin-N-succinimida antes de abrirla. (Se conserva desecada a 0°C).
- c) - Disolverla en dimetilsulfóxido a 1 mg/ml en el momento de usarla, ya que su vida media es de minutos.
- d) - Añadir 100 μl de éster por cada ml de anticuerpo. En el caso de anticuerpos monoclonales, esta cantidad puede variar de 60 a 240 μl por ml de anticuerpo monoclonal.
- e) - Mantener dos horas a temperatura ambiente.
- f) - Dializar frente a P.B.S. con timerosal al 0,01%.

g) - Almacenar a -20°C mezclando al 50% con glicerol.

3.2.18.- METODO DE E.L.I.S.A.

3.2.18.1.- DETERMINACION DE ANTICUERPOS

Se utilizó un E.L.I.S.A. indirecto, que consta de las siguientes etapas:

- a) - **Fijación del antígeno** diluido en tampón carbonato a pH 9,6. Añadir 100 ul/pocillo a una concentración de 1 ug/ml y dejar actuar durante 18 horas a 4°C. (Antígeno E/S, antígeno total larvario o antígeno total de adultos).

Lavar tres veces con P.B.S.-Tween-20 para eliminar los restos de antígeno no fijados o fijados deficientemente.

- b) - **Postapizado.** Añadir 250 ul/pocillo de B.S.A. al 0,1% en P.B.S. dejándolo actuar durante una hora a 37°C.

Lavar tres veces con P.B.S.-Tween-20 para eliminar los restos de B.S.A..

- c) - **Adición del suero.** Añadir 100 ul/pocillo de los sueros por duplicado a la dilución 1/150 en P.B.S.-Tween-20, B.S.A. al 0,1% y dejar actuar durante dos horas a 37°C.

Lavar tres veces con P.B.S.-Tween-20 para eliminar los anticuerpos que no hubieran reaccionado.

- d) - **Adición del conjugado.** Añadir inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugadas con peroxidasa a la dilución apropiada en P.B.S.-Tween-20, B.S.A. al 0,1%. Se añaden 100 ul/pocillo y se dejan reaccionar con los anticuerpos específicos unidos a los antígenos, durante una hora a 37°C.

Lavar tres veces con P.B.S.-Tween-20 para eliminar las anti-inmunoglobulinas marcadas que no hubieran reaccionado.

- e) - **Adición del sustrato.** Se utiliza o-fenilenodiamina al 0,04% en tampón citrato-fosfato a pH 5, al que se añaden 4 ul de peróxido de hidrógeno por cada 10 ml de solución. Añadir 100 ul/pocillo y dejar actuar a temperatura ambiente y en la oscuridad hasta que los blancos empiecen a adquirir color.
- f) - **Frenado de la reacción.** Añadir 50 ul/pocillo de SO_4H_2 3 N.
- g) - **Lectura.** Leer la D.O. a 492 nm del producto final coloreado.

Nota: Una porción de la placa se utilizó como control de B.S.A., es decir, simultáneamente se realizó un control de E.L.I.S.A. sin la adición de antígeno, para asegurar que la reacción colorimétrica era debida a la formación del complejo antígeno-anticuerpo y no a reacciones inespecíficas.

Para la interpretación de los resultados se determina el Índice D.O. problema/D.O. testigo (I D.O.p/D.O.t) consistente en dividir la D.O. media de los problemas entre la del correspondiente testigo negativo, una vez restada la D.O. resultante de la fijación inespecífica de cada suero a la B.S.A. utilizada en el postapizado.

3.2.18.2.- DETERMINACION DE INMUNOCOMPLEJOS

Se utilizó un E.L.I.S.A. "sandwich" que consta de las siguientes etapas:

- a) - **Tapizado o sensibilizado.** Se realiza por fijación de suero de conejo anti-Toxocara purificado y precipitado con ácido caprílico y sulfato amónico saturado (3.2.15.). Las placas se sensibilizan con 12,5 ug/ml de dicho antisuero en tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6 y se deja actuar toda la noche a 40°C, tras la adición de 100 ul/pocillo.

Lavar tres veces con P.B.S.-Tween 20 para eliminar los anticuerpos deficientemente fijados y los no fijados.

- b) - **Postapizado.** Añadir 250 ul/pocillo de B.S.A. al 0,1% en P.B.S. e incubar una hora a 37°C.

Lavar tres veces con P.B.S.-Tween 20 para eliminar los restos de B.S.A..

- c) - **Adición del suero.** Añadir 100 ul/pocillo de los sueros problema y controles a la dilución 1/25 en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1% y dejar actuar durante tres horas a 37°C. El antígeno, presente en los inmunocomplejos, reaccionará con sus anticuerpos específicos fijados previamente a la placa.

Lavar tres veces con P.B.S.-Tween 20 para eliminar los restos de la muestra no fijados y los antígenos que no hayan reaccionado.

- d) - **Adición del conjugado.** Añadir inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugadas con peroxidasa, diluidas en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1%. Se añaden 100 ul/pocillo y se deja actuar durante una hora a 37°C. Estos anticuerpos marcados reaccionan con los anticuerpos presentes en los inmunocomplejos previamente insolubilizados.

Lavar tres veces con P.B.S.-Tween 20 para eliminar las anti-inmunoglobulinas que no hayan reaccionado.

- e) - **Adición del sustrato.** Añadir 100 ul/pocillo de o-fenilenodiamina en tampón citrato-fosfato con peróxido de hidrógeno, en las proporciones indicadas anteriormente (3.2.18.1.). Dejar actuar a temperatura ambiente y en la oscuridad hasta que los blancos empiecen a tomar color.

- f) - **Frenado de la reacción.** Añadir 50 ul/pocillo de SO_4H_2 3 N.

- g) - **Lectura.** Leer la D.O. a 492 nm del producto final coloreado.

Nota: Una porción de la placa se utilizó como control de B.S.A., es decir, simultáneamente se realizó un control de E.L.I.S.A. sin tapizar con el suero de conejo anti-Toxocara, para asegurar que la reacción colorimétrica era debida a la formación del complejo anticuerpo-inmunocomplejo y no a reacciones inespecíficas.

Para la interpretación de los resultados, como en el caso de la determinación de anticuerpos específicos, se utiliza el Índice D.O. problema/D.O. testigo (I D.O.p/D.O.t), descrito anteriormente.

3.2.18.3.- DETECCION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1 EN SUERO DE CONEJO.

Para la detección del anticuerpo monoclonal TC-1 (origen murino) circulante en el suero de conejos, se utilizó un E.L.I.S.A. "sandwich" cuyo fundamento es el siguiente:

- a) - **Tapizado o sensibilizado.** Fijación de inmunoglobulinas de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón a 5 ug/ml en tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6. Dejar actuar toda la noche a 4°C, tras la adición de 100 ul/pocillo.

Lavar tres veces con P.B.S.-Tween 20 para eliminar los anticuerpos mal fijados y los no fijados a la placa.

- b) - **Postapizado.** Añadir 250 ul/pocillo de B.S.A. al 0,1% en P.B.S. e incubar una hora a 37°C.

Lavar tres veces con P.B.S.-Tween 20 para eliminar los restos de B.S.A..

- c) - **Adición del suero.** Añadir 100 ul/pocillo de los sueros a ensayar a la dilución 1/50 y del control positivo (TC-1) a 2,5 ug/ml en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1% y dejar actuar dos horas a 37°C. El anticuerpo monoclonal TC-1 presente en el suero de conejo será reconocido por las anti-inmunoglobulinas de ratón.

Lavar tres veces con P.B.S.-Tween 20 para eliminar el anticuerpo monoclonal que no hubiera reaccionado.

- d) - **Adición del conjugado.** Añadir 100 ul/pocillo de inmunoglobulinas de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón, marcadas con peroxidasa a la dilución apropiada, en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1%. Incubar durante una hora a 37°C.

Lavar tres veces con P.B.S.-Tween 20 para eliminar las anti-inmunoglobulinas marcadas que no hubieran reaccionado.

- e) - **Adición del sustrato.** Añadir 100 ul/pocillo de o-fenilenodiamina en tampón citrato-fosfato con peróxido de hidrógeno, en las proporciones indicadas anteriormente (3.2.18.1.). Dejar actuar a temperatura ambiente y en la oscuridad hasta que los blancos empiezan a tomar color.

- f) - **Frenado de la reacción.** Añadir 50 ul/pocillo de SO_4H_2 3 N.

- g) - **Lectura.** Leer la D.O. a 492 nm del producto final coloreado.

Nota: Una porción de la placa se utilizó como control de B.S.A., es decir, simultáneamente se realizó un control de E.L.I.S.A. sin tapizar con anti-inmunoglobulinas de ratón, para asegurar que la reacción colorimétrica era debida a la formación del complejo anti-inmunoglobulina de ratón-anticuerpo monoclonal TC-1 y no a reacciones inespecíficas. Los resultados se expresan como D.O..

3.2.19.- OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-IDOTIPO FRENTE AL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1

3.2.19.1.- OBTENCION DE LOS FRAGMENTOS F(ab')_2 DEL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1

Los fragmentos F(ab')_2 del anticuerpo monoclonal TC-1 se obtuvieron mediante un tratamiento de digestión péptica.

- a) - Preparar una solución de pepsina en tampón citrato 0,1 M, pH 3,5 a una concentración de 2 mg/ml.
- b) - Fraccionar y congelar rápidamente a -30°C
- c) - Centrifugar el anticuerpo monoclonal TC-1, purificado previamente mediante precipitación con ácido caprílico y sulfato amónico saturado (3.2.15.), a 4°C y 3.000 r.p.m. durante 20 minutos. Resuspender el precipitado en tampón P.B.S..
- d) - Dializar a 4°C frente a tampón citrato 0,1 M, pH 6 durante toda la noche y posteriormente frente a tampón citrato 0,1 M, pH 3,5 durante cuatro horas.
- e) - Ajustar el pH a 3,5 con tampón citrato 1 M, pH 3,5.
- f) - Medir la concentración por lectura de la D.O. a 280 nm, teniendo en cuenta que la concentración óptima para la digestión debe estar comprendida entre 1 y 4 mg/ml.
- g) - Para el procesamiento posterior mediante electroforesis en SDS-PAGE, tomar dos alícuotas de 10 µl de la muestra del anticuerpo monoclonal TC-1 antes de hacer la digestión, sobre 5 µl de tampón Tris 3 M, pH 8. Conservar a -20°C.
- h) - Transferir la solución de pepsina en baño de hielo, sobre la muestra de anticuerpo monoclonal a digerir. Para la reacción de digestión la relación enzima-proteína será de 1:60.
- i) - Incubar durante 90 minutos a 37°C en baño de agua.
- j) - Frenar la reacción elevando el pH a 7 mediante la adición de tampón Tris 3 M, pH 8 en la proporción indicada en el apartado g), fraccionar y congelar a -20°C. Seleccionar dos alícuotas de 10 µl para su procesamiento posterior en geles de SDS-PAGE.

3.2.19.2.- AISLAMIENTO, CARACTERIZACION Y PURIFICACION DE LOS
FRAGMENTOS $F(ab')_2$ DEL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1

- a) - Dializar a 40C las muestras de anticuerpo monoclonal TC-1, digerido y sin digerir (3.2.19.1.), frente a tampón P.B.S. 2x durante toda la noche, tampón P.B.S. 1,5x durante cuatro horas y tampón P.B.S. 1x durante toda la noche.
- b) - Las muestras, digerida ($t=final$) y sin digerir ($t=0$), se someten a electroforesis en SDS-PAGE (según método de LAEMMLI, 1.970) en condiciones no reductoras y reductoras, a la concentración adecuada de gel.
- c) - Si se detectan fragmentos de bajo peso molecular, purificar a través de una columna de ultragel ACA 44, (tamaño = 40 cm x 1,6 cm, límite de exclusión 200.000 D).
- d) - Lavar la columna con tampón P.B.S. 2x, azida sódica al 0,02%, pasando a continuación la muestra.
- e) - Eluir con tampón P.B.S. 2x, azida sódica 0,02%, recogiendo aproximadamente 2 ml/tubo.
- f) - Caracterizar las fracciones seleccionadas en SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras.
- g) - Si en el gel se aprecian bandas correspondientes al anticuerpo monoclonal TC-1 sin digerir, concentrar la muestra obtenida tras la mezcla de las fracciones anteriormente seleccionadas, mediante sistema de Amicon Centriprep 30, (sistema de concentración para volúmenes de 5 a 15 ml hasta 0,5-0,7 ml, con un corte de membrana de 30.000 D) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.19.3.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

3.2.19.3.1.- Preparación del gel de resolución

- a) - Preparar el gel a la concentración de acrilamida-bisacrilamida deseada, según tabla de preparación de geles por el método de LAEMMLI, (LAEMMLI, 1.970) incluida en el apartado 3.1.3..
- b) - Degasear en un kitasato mediante vacío durante 5-10 minutos y poner en baño de hielo durante un minuto.
- c) - Añadir las cantidades de persulfato amónico y TEMED adecuadas según el protocolo referido en el punto a), y mezclar bien.
- d) - Cargar el gel entre los dos cristales utilizando una jeringa con aguja de 19 G, rápidamente pero sin hacer burbujas, hasta la altura deseada.
- e) - Con ayuda de una pipeta Pasteur, añadir agua destilada encima, con cuidado de que quede una interfase nítida, para que el frente del gel quede recto al solidificarse.
- f) - Dejar gelificar hasta el día siguiente.

3.2.19.3.2.- Preparación del gel de concentración

- a) - Retirar el agua depositada sobre el gel de resolución por inclinación y con ayuda de papel de filtro Whatman nº1, con cuidado de que no queden restos.
- b) - Hacer la mezcla para el gel de separación según el protocolo de LAEMMLI, (LAEMMLI, 1.970) reseñado en el apartado 3.1.3., para obtener una concentración de acrilamida del 3,75%.
- c) - Degasear durante dos minutos en baño de hielo.

- d) - Añadir la cantidad apropiada de TEMED y persulfato amónico, según el protocolo referido en el punto b), para que comience la polimerización.
- e) - Cargar cuidadosamente el gel entre los cristales utilizando una jeringa con aguja de 19 G, añadiéndolo sólo por uno de los lados para evitar corrientes de convección.
- e) - Colocar el peine elegido según el tamaño del pocillo deseado, introduciéndolo de lado para evitar la formación de burbujas y rellenar con ayuda de una jeringa.
- f) - Dejar gelificar entre 30 y 40 minutos.

3.2.19.3.3.- Preparación de las muestras

- a) - Diluir la muestra en proporción 1:1 en tampón de la muestra 2x.
- b) - Añadir una gota de azul de bromofenol (0,01% en tampón de la muestra 2x) y 5 ul de 2-mercaptoetanol (en el caso de geles en condiciones reductoras) para muestras de 50 a 80 ul.
- c) - Hervir en tubos Eppendorf durante tres minutos en baño de agua (para las muestras a caracterizar en condiciones reductoras).

3.2.19.3.4.- Aplicación de las muestras

- a) - Pasados los 30-40 minutos necesarios para la solidificación del gel de concentración, sacar el peine del mismo, eliminando los restos de tampón que puedan quedar en las calles con papel de filtro Whatman nº1.
- b) - Dispensar las muestras en las posiciones establecidas previamente, con ayuda de pipeta automática con micropunta, cargando de 50 a 80 ul por calle.

- c) - Rellenar el resto de cada pocillo con el tampón de cubeta, con ayuda de una pipeta Pasteur y con cuidado de que quede una interfase nítida entre la muestra y el tampón.
- d) - Montar el resto de la cubeta, relleno con tampón de cubeta de forma que queden cubiertos la parte inferior del gel y el electrodo superior.
- e) - Conectar las gomas de refrigeración y tapar.

3.2.19.3.5.- Desarrollo de la electroforesis

- a) - Ajustar la corriente a 25 mA con intensidad constante hasta que las muestras penetren en el gel de resolución.
- b) - Aumentar la intensidad a 30 mA, calculando que el frente estará a 1 cm del final aproximadamente cinco horas más tarde.
- c) - Cuando el desarrollo del frente esté a 1 cm del final del gel, parar la electroforesis desconectando el aparato.

3.2.19.3.6.- Tinción de los geles

- a) - Sacar el gel con ayuda de una espátula con parafilm para no dañar los cristales, separando ambas placas y desechando el gel de concentración.
- b) - Poner en la solución de tinte (azul de Coomassie al 0,1% en ácido tricloroacético al 30%) durante 30 minutos.
- c) - Aclarar con ácido acético al 7% en agua destilada hasta que el fondo sea transparente.

3.2.19.3.7.- Secado de los geles

Seguimos la técnica de WALLEVIK y col. (1.982).

- a) - Poner el gel entre dos hojas de celofán mojadas con solución de aclarado y cerrar los marcos con pinzas de forma que quede tenso.
- b) - Someter a corriente de aire durante ocho horas.
- c) - Antes de destensar, comprobar que está bien seco.

3.2.19.4.- PAUTA DE INMUNIZACION DE LOS CONEJOS

La pauta de inmunización se realizó en dos conejos y consistió en una primera inoculación, por vía intradérmica (I.D.), de 400 ug de los fragmentos $F(ab')_2$ purificados (3.2.19.2.), diluidos en 1 ml de P.B.S.. Para ello se emulsionaron en el mismo volumen de adyuvante completo de Freund 2x, inoculándolos, una vez formada la emulsión, en 30-50 dosis en el lomo del animal previamente rasurado. Posteriormente se administraron tres recuerdos de 125 ug de inmunógeno en 0,5 ml de P.B.S., emulsionados en el mismo volumen de adyuvante incompleto de Freund. En estos casos, la inoculación se realizó, por vía I.M., en la pata trasera. El primer recuerdo se administró a los 45 días de la primera inmunización, el segundo recuerdo 15 días después del primero y el último a los 35 días del segundo. (Esquema II).

3.2.19.5.- SANGRADO DE LOS CONEJOS

Inmediatamente después de la administración del primer recuerdo, se tomó una muestra preliminar de suero. Tras la administración del segundo recuerdo de inmunógeno, se realizaron dos sangrados con un intervalo semanal. El tercer sangrado se realizó a los 28 días del segundo, coincidiendo con una semana p.i. del tercer recuerdo y finalmente, se efectuó un cuarto sangrado a los siete días del tercero. (Esquema II).

Esquema II

Pauta de inmunización y sangrado

1ª DOSIS	I.D. (400 ug) ACF 45 días
1º RECUERDO y TOMA DE MUESTRA	I.M. (125ug) AIF 15 días
2º RECUERDO	I.M. (125ug) AIF 7 días
	1ª SANGRADO 7 días
	2ª SANGRADO 21 días
3º RECUERDO	I.M. (125ug) AIF 7 días
	3ª SANGRADO 7 días
	4ª SANGRADO

I.D. = intradérmica

ACF = adyuvante completo de Freund

I.M. = intramuscular

AIF = adyuvante incompleto de Freund

=====

3.2.19.6.- PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

3.2.19.6.1.- Columna de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno y acoplada a inmunoglobulinas de ratón.

Los anticuerpos anti-isotipo formados en el conejo, tras su inmunización con los fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo monoclonal TC-1, se eli-

minaron en lo posible haciendo pasar el suero por una columna de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno a la que se habían fijado inmunoglobulinas de ratón.

3.2.19.6.1.1.- Montaje de la columna y acoplamiento de inmunoglobulinas de ratón.

Para el montaje de la columna de afinidad se procedió de la siguiente forma:

- a) - Pesar 2 g. de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia) y añadir 10 ml de ClH 1 mM (1 g. de Sepharosa proporciona unos 3,5 ml de gel). Agitar cuidadosamente.
- b) - Traspasar el gel a la columna, colocando placa porosa en el fondo para evitar su pérdida y mantener en agitación rotatoria durante 15 minutos a 40°C.
- c) - Una vez hinchado convenientemente el gel, lavar la columna con 200 ml de ClH 1 mM.
- d) - Pasar aproximadamente 50 ml de tampón de acoplamiento (CO_3HNa 0,1 M pH 8,3 conteniendo ClNa 0,5 M) para equilibrar la columna a pH 8,3, controlando el pH de salida.
- e) - Resuspender la muestra de proteínas (inmunoglobulinas de suero de ratón precipitadas con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) en tampón P.B.S., calculando de 5-10 mg de proteína por ml de gel y de 1-5 mg de proteína por ml de tampón.
- f) - Dializar frente a tampón de acoplamiento (CO_3HNa 0,1 M, pH 8,3 conteniendo ClNa 0,5 M), toda la noche a 40°C y en agitación.
- g) - Añadir la solución de proteínas a la columna y mantener en agitación rotatoria toda la noche a 40°C o dos horas a temperatura ambiente.

- h) - Lavar con tampón de acoplamiento, recoger los 10 primeros ml y leer la D.O. a 280 nm. para calcular el rendimiento en el acoplamiento.
- i) - Lavar dos veces la columna con unos 50 ml de tampón de acoplamiento cada vez, leyendo del mismo modo la D.O. del filtrado a 280 nm. Si se siguiera detectando proteína, no debe sobrepasar el 10% de lo inicialmente leído.
- i) - Una vez acopladas las proteínas, bloquear los sitios libres añadiendo aproximadamente 20 ml de glicina 0,2 M, pH 8 en tampón de acoplamiento y mantener en agitación rotatoria dos horas a temperatura ambiente.
- k) - Lavar la columna con tres ciclos de 150 ml de tampón acetato 0,1 M ClNa 0,5 M, pH 4 y 150 ml de tampón de acoplamiento (50 ml de cada tampón en cada ciclo), comprobando los cambios de pH.
- l) - Equilibrar la columna con tampón P.B.S.-azida sódica al 0,02%, hasta pH 7,2 y conservar así a 4°C hasta su uso.

3.2.19.6.1.2.- Aplicación del suero de conejo.

- a) - Lavar la columna con 10 volúmenes de tampón T.B.S. pH 8,6 (Tris 0,05 M, ClNa 0,1 M), 10 volúmenes de glicina-clorhídrica pH 2,3 (glicina 0,05 M, ClNa 0,15 M) y otros 10 volúmenes de tampón T.B.S..
- b) - Comprobar el pH de salida (8,6) antes de empezar a pasar la muestra.
- c) - Filtrar la muestra por 0,45 μ m y llevar a pH 8,6 diluyéndolo 1:1 en tampón T.B.S. pH 8,6.
- d) - Aplicar la muestra en la columna y mantener en agitación rotatoria toda la noche a 4°C.

- e) - Recoger el filtrado, en fracciones de aproximadamente 2 ml, leyendo la D.O. a 280 nm, para calcular la cantidad de proteína contenida en el mismo.
- f) - Filtrar la muestra recogida por 0,45 μ m, inactivar, fraccionar y congelar.
- g) - Lavar la columna con 25 ml de tampón P.B.S. y recuperar la misma eluyendo con glicina-clorhídrica pH 2,3 (glicina 0,05 M, ClNa 0,15 M). Recoger fracciones de aproximadamente 2 ml, sobre tubos con 50 μ l de tampón Tris 3M pH 8.
- h) - Leer la D.O. a 280 nm de las fracciones eluidas, calculando la cantidad de inmunoglobulinas retenidas.
- i) - Equilibrar la columna con tampón P.B.S.-azida sódica al 0,02%, hasta pH 7,2 y conservar así a 4°C hasta su uso.

3.2.19.7.- AISLAMIENTO DE LAS INMUNOGLOBULINAS IgG DEL SUERO

ANTI-IDIOTÍPICO MEDIANTE COLUMNA DE PROTEÍNA A-SEPHAROSA 4B

- a) - Pesar 1.5 g. de Proteína A-Sepharosa 4B y colocar en un vaso de precipitados con 15 ml de tampón P.B.S. al menos durante 15 minutos.
- b) - Traspasar el gel a la columna, colocando placa porosa en el fondo para evitar su pérdida.
- c) - Dejar bajar el líquido y añadir, antes de que se seque, tampón T.B.S. (Tris 0,05 M-ClNa 0,1 M pH 8,6), equilibrando hasta que el pH de salida sea 8,6.
- d) - Lavar la columna con 20 ml de tampón T.B.S. pH 8,6 y conservar a 4°C hasta su uso.
- e) - Preparar la muestra, suero policlonal de conejo, filtrando por 0,45 μ m y ajustar el pH con NaOH a 8,6.

- f) - Aplicar la muestra sobre el gel, rellenar con tampón T.B.S. y mantener en agitación rotatoria toda la noche a 4°C.
- g) - Recoger el filtrado comprobando la actividad del mismo.
- h) - Lavar con tampón T.B.S. para eliminar bien lo no unido a la Proteína A, hasta que la D.O. coincida con la del T.B.S..
- i) - Preparar los tubos con 50 ul de tampón Tris 3M pH 8.
- j) - Eluir la columna con glicina-clorhídrica (glicina 0,05 M, ClNa 0,15 M) pH 2,3, recogiendo fracciones de 2 ml/tubo.
- k) - Leer la D.O. en cada tubo a 280 nm.
- l) - Mezclar los tubos correspondientes al pico de absorbancia y dializar a 4°C y toda la noche frente a tampón P.B.S. 2x, dos horas frente a tampón P.B.S. 1,5x y toda la noche frente a tampón P.B.S. 1x. Fraccionar en alícuotas y congelar.
- m) - Equilibrar la columna, lavándola con tampón P.B.S.-azida al 0,02% y conservar a 4°C hasta su uso.

3.2.20.- CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO

3.2.20.1.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTI-ISOTIPICA

Para determinar la ausencia de actividad anti-isotípica se realizó un E.L.I.S.A. frente a inmunoglobulinas de ratón: las placas se tapizaron durante toda la noche a 4°C, con 100 ul/pocillo de inmunoglobulinas de ratón diluidas en tampón carbonato pH 9,6, a 5 ug/ml. Tras el postapizado con B.S.A. al 1% durante dos horas a 37°C, se añadieron 100 ul de distintas diluciones del suero anti-idiotípico en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1%, incubando dos horas a temperatura ambiente. La reacción se reveló añadiendo 100 ul/pocillo de inmunoglobulinas de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo marcadas con peroxidasa y diluidas en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1%.

incubando a 37°C durante una hora. El sustrato y la solución de frenado fueron las utilizados habitualmente, realizándose asimismo los lavados correspondientes entre cada paso, por el método descrito (3.2.18.). Como control en el ensayo se utilizó suero de conejo negativo, incubado y revelado en las mismas condiciones que el suero anti-idiotípico.

3.2.20.2.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTI-IDIOTÍPICA

El reconocimiento específico del idiotipo correspondiente, anticuerpo monoclonal TC-1, se realizó mediante E.L.I.S.A, siguiendo los pasos anteriormente descritos (3.2.20.1.) tras el tapizado de las placas con el citado TC-1 a 5 ug/ml.

También se ensayó la actividad frente otro anticuerpo monoclonal específico del mismo antígeno E/S, el anticuerpo monoclonal TC-2, mediante un E.L.I.S.A. realizado en las mismas condiciones.

Del mismo modo que en el caso anterior, como control en el ensayo se utilizó suero de conejo negativo, incubado y revelado en las mismas condiciones que el suero anti-idiotípico.

3.2.20.3.- ESTUDIO DE LA SEMAJANZA ESTRUCTURAL ENTRE LOS ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO Y EL ANTIGENO EXCRETOR-SECRETOR LARVARIO

3.2.20.3.1.- Estudios de inhibición de la unión del anticuerpo idiotípico (anticuerpo monoclonal TC-1) al antígeno excretor-secretor larvario

3.2.20.3.1.1.- Mediante E.L.I.S.A.

Otros de los ensayos realizados para caracterizar los anticuerpos anti-idiotipo producidos, fueron dos tipos de E.L.I.S.A. de inhibición, tendentes a evaluar el desplazamiento de la unión antígeno E/S-TC-1 por el anticuerpo anti-idiotipo.

La metodología seguida en el primero de estos ensayos E.L.I.S.A., fue la siguiente:

- a) - Tapizar con el antígeno E/S y postapizar con B.S.A. según la pauta indicada en el apartado 3.2.18.1..
- b) - Preincubar en baño de agua durante dos horas a 37°C y con suero negativo de ratón al 1%, distintas diluciones del anticuerpo monoclonal TC-1 en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1%, sólo o con el suero anti-idiotípico a concentración constante.
- c) - Centrifugar a 15.000 r.p.m. durante tres minutos, recoger el sobrenadante y añadir a continuación 100 ul/pocillo a la placa, incubando dos horas a 37°C.
- d) - El resto de las etapas se realizó según el método E.L.I.S.A. habitual descrito en el apartado 3.2.18..

Para el segundo de los ensayos E.L.I.S.A. realizado con el mismo fin, se procedió de la siguiente forma:

- a) - Tapizar y postapizar las placas del mismo modo que en el caso anterior.
- b) - Preincubar el anticuerpo monoclonal TC-1 conjugado con biotina a concentración constante en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1% , con diluciones dobles seriadas en el mismo diluyente de: antígeno E/S, suero de conejo negativo y fracción IgG del suero anti-idiotípico obtenida mediante paso por Proteína-A (3.2.19.7.), durante cuatro horas a temperatura ambiente.
- c) - Centrifugar a 15.000 r.p.m. durante tres minutos, recoger el sobrenadante y añadir 100 ul/pocillo sobre la placa.
- d) - Incubar dos horas a temperatura ambiente.
- d) - Revelar con 100 ul/pocillo de estreptavidina-peroxidasa a la dilución apropiada en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1%, durante 45

minutos y revelar por el sistema habitual (3.2.18.).

3.2.20.3.1.2.- Mediante microprecipitación larvaria

- a) - Tapizar placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos con B.S.A. al 1%, añadiendo 250 ul/pocillo, incubar en estufa a 37°C durante dos horas, lavar con P.B.S. y dejar secar.
- b) - Incubar en baño de agua a 37°C y por duplicado, con un 1% de suero negativo de ratón en H.B.S.S., los siguientes reactivos:
 - Diluciones dobles seriadas de los anticuerpos monoclonales TC-1 y TC-2 sólo, o con una concentración constante del suero anti-idiotípico.
 - Diluciones dobles seriadas de los controles murinos, positivo y negativo, sólo, o con una concentración constante del suero anti-idiotípico.
 - Controles de placa y de viabilidad larvaria (H.B.S.S., suero anti-idiotípico y sueros murinos positivo y negativo).
- c) - Una vez incubados, centrifugar a 15.000 r.p.m. durante dos minutos y recoger el sobrenadante.
- d) - Añadir 100 ul/pocillo de cada dilución en la placa de cultivo.
- e) - Añadir a cada pocillo 20 ul de una suspensión de larvas de T. canis recién eclosionadas, a una concentración de 20-25 larvas/pocillo.
- f) - Incubar en estufa a 37°C y realizar la lectura microscópicamente a las 24 y 48 horas.
- g) - Para la interpretación de los resultados seguir el siguiente criterio de cuantificación:
0 : ninguna larva con precipitados.

- * : pocas larvas con precipitados.
- 1 : larvas con precipitados pero no sueltos en el medio.
- 2 : todas las larvas con precipitados, pocos sueltos en el medio.
- 3 : precipitados abundantes en larvas y medio.

3.2.20.3.2.- Inducción de la formación de anticuerpos anti-anti-idiotipo

3.2.20.3.2.1.- Pauta de inmunización

La inducción de anticuerpos anti-anti-idiotipo se realizó en un conejo, siguiendo la misma metodología utilizada para la obtención de los anticuerpos anti-idiotipo descrita en el apartado 3.2.19.4.. En este caso el inmunógeno consistió en un preparado de IgG aisladas del suero anti-idiotípico purificado, mediante columna de Proteína A-Sepharosa 4B. En la primera inoculación se administraron 390 ug en 1 ml de P.B.S. emulsionados en adyuvante completo de Freund 2x y en los recuerdos la dosis fue de 120 ug de inmunógeno en 0,5 ml de P.B.S. y emulsionados en el mismo volumen de adyuvante incompleto de Freund.

3.2.20.3.2.2.- Sangrado

Inmediatamente después de la administración del primer recuerdo de las IgG anti-idiotipo (inmunógeno) se tomó una muestra preliminar de suero. Los posteriores sangrados se realizaron a los mismos tiempos señalados para la obtención de los anticuerpos anti-idiotipo (3.2.19.5.).

3.2.20.3.2.3.- Ensayo de unión al antígeno excretor-secretor larvario

La actividad del suero obtenido tras la inmunización del conejo con el preparado de anticuerpos anti-idiotipo, se estudió en un E.L.I.S.A siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.2.18.1., tras el tapizado de las placas con el antígeno E/S.

3.2.20.3.3.- Posible utilización de los anticuerpos anti-idiotipo como réplica idiotípica del antígeno excretor-secretor larvario: Aplicación en la detección de anticuerpos específicos en suero murino mediante E.L.I.S.A.

3.2.20.3.3.1.- Ensayos directos

La posible utilización del suero anti-ídiotípico para la detección de anticuerpos específicos en suero murino, mediante E.L.I.S.A., se ensayó siguiendo la metodología habitual descrita en el apartado 3.2.18.1., pero tapizando las placas con el suero anti-idiotípico a 10 ug/ml y ensayando los sueros murinos a distintas diluciones.

3.2.20.3.3.2.- Ensayos de inhibición

- a) - Tapizar las placas con 50 ul de Proteína A-Sepharosa 4B a 5 ug/ml, diluida en tampón carbonato pH 9,6 durante toda la noche a 4°C.
- b) - Postapizar con 50 ul de B.S.A. al 1% en P.B.S. durante dos horas a 37°C.
- c) - Sensibilizar las placas mediante la adición de 50 ul del suero anti-idiotípico diluido en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1%, dejándolo actuar durante toda la noche a 4°C.
- d) - Añadir 50 ul de suero de conejo negativo al 1% en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1%, dejándolo actuar durante una hora a temperatura ambiente.
- e) - Añadir 50 ul de suero murino negativo al 1% en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1%, e incubar durante una hora a temperatura ambiente.
- f) - Añadir 50 ul de los sueros murinos positivos (anti-Toxocara) y de los correspondientes sueros murinos control negativos a ensayar,

a la dilución 1/100 en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1%, e incubar durante 90 minutos a 37°C y durante una hora a temperatura ambiente.

g) - Añadir 50 ul del anticuerpo monoclonal TC-1 conjugado con biotina a la dilución apropiada en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1%, con un 1% de inmunoglobulinas de ratón, e incubar durante toda la noche a 4°C.

h) - Incubar con 50 ul de estreptavidina-peroxidasa a la dilución adecuada en P.B.S.-Tween 20, B.S.A. al 0,1%, durante 90 minutos a temperatura ambiente.

i) - Para el revelado, frenado y lectura de las placas, proceder como en ocasiones anteriores (3.2.18.).

3.2.21.- TRATAMIENTO ESTADISTICO

3.2.21.1- ESTUDIO ESTADISTICO DE CADA MUESTRA

Media aritmética: La media aritmética es un conjunto de n números: X_1, X_2, \dots, X_n , que se define por \bar{X} , siendo

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n} = \frac{\sum X_i}{n}$$

Desviación típica: El grado en que los datos numéricos tienden a desviarse de un promedio se llama dispersión de datos. Una de las medidas de dispersión es la "desviación típica", la cual, considerando un conjunto de n números X_i , viene definida por

$$D.T. = s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (X_i - \bar{X})^2}{n}}$$

Cuanto mayores sean las desviaciones con respecto a la media, mayor será el valor de "s"; un valor relativamente pequeño de "s" implica concentración alrededor de la media aritmética.

A veces, en la desviación típica, se sustituye "n" por n-1, cuando $n < 30$, pues la fórmula da valores menores que los reales para la desviación típica, debido a la tendencia, en una muestra pequeña, de dejar mal representadas las variaciones más amplias con respecto a la media.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Desviación standard: Viene definido por la expresión

$$D.S. = \frac{D.T.}{\sqrt{n}}$$

Su valor equivale al de la desviación típica cuando el experimento se repite varias veces. La desviación típica es un índice que mide la "dispersión real" de los valores de la muestra: valores individuales medidos uno a uno, en los componentes de la muestra; es un índice descriptivo de la concentración de los datos. Sin embargo, la desviación standard mide la "dispersión imaginaria" que presentarían las sucesivas medias que se obtendrían ante una hipotética repetición del experimento.

3.2.21.2.- COMPARACION DE DOS MUESTRAS

Se utiliza la prueba de la "t" de Student:

$$t = \frac{(X_1 - X_2) - (u_1 - u_2)}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}}$$

El numerador representa una desviación de la media muestral respecto de una media paramétrica y el denominador representa un error típico para tal desviación. En nuestro caso, el numerador indica una desviación entre las dos medias muestrales X_1 y X_2 y la verdadera diferencia entre las medias de los problemas (u_1 y u_2) representadas por estas medias muestrales.

En un test de esta clase, la hipótesis nula es que las dos muestras proceden de una misma población, es decir, deben poseer la misma media paramétrica ($u_1 - u_2 = 0$).

Los grados de libertad apropiados para esta expresión son: $n_1 + n_2 - 2$, SOKAL Y ROMLF, 1979.

Una vez calculada la "t" de Student real se compara con la "t" de Student teórica para una significación estadística, que viene dada para una p determinada ($p < 0,001$; $p < 0,005$; $p < 0,01$; $p < 0,05$). En caso de que la "t" de Student real sobrepase la "t" de Student teórica para la probabilidad fijada, la diferencia entre las dos muestras estudiadas se considera significativa y, en caso contrario, se considera no significativa.

ESQUEMA DE PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO

ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1 PURIFICADO (Ab1)

Digestión péptica

Filtración en gel

FRAGMENTOS $F(ab')_2$

ANALISIS EN SDS-PAGE



INMUNOSUERO (Ab2)

Imunoadsorción
en SEPHAROSA-Ig Ratón

REACTIVO ANTI-IDIOTIPICO

CARACTERIZACION

Ab3
(anticuerpos anti-anti-idiotipo)

1. Ausencia de actividad anti-isotópica
2. Unión específica al anticuerpo idiotípico
3. Competencia inmunológica con el antígeno por la unión al anticuerpo idiotípico.
4. Capacidad de producción de anticuerpos similares al Ab1 (anticuerpos anti-anti-idiotipo).

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- ESTUDIO DE LA MIGRACION LARVARIA DE T. canis

4.1.1.- ESTUDIO EN HIGADO, PULMONES, VISCERAS, PATAS TRASERAS, CANAL Y CEREBRO

4.1.1.1.- EN RATONES BALB/c

TABLA I
BALB/c 2º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	172 93,98	8 4,37	1 0,54	0 0	2 1,09	0 0	183
R ₂	162 93,10	4 2,29	2 1,14	0 0	6 3,44	0 0	174
R ₃	112 94,11	2 1,68	1 0,84	4 3,36	0 0	0 0	119
R ₄	129 94,85	2 1,47	1 0,73	2 1,47	2 1,47	0 0	136
R ₅	139 93,91	7 4,72	0 0	0 0	2 1,35	0 0	148
R ₆	106 91,37	6 5,17	0 0	4 3,44	0 0	0 0	116

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA II
BALB/c 3º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	98 37,83	48 18,53	18 6,94	8 3,08	68 26,25	19 7,33	259
R ₂	130 66,66	41 21,02	8 4,10	2 1,02	12 6,15	2 1,02	195
R ₃	158 56,63	47 16,84	12 4,30	8 2,86	46 16,48	8 2,86	279
R ₄	142 67,29	39 18,48	8 3,79	4 1,89	14 6,63	4 1,89	211
R ₅	180 72,87	45 18,21	6 2,42	2 0,80	10 4,04	4 1,61	247
R ₆	143 50,00	72 25,17	14 4,89	8 2,79	38 13,28	11 3,84	286

TABLA III
BALB/c 4º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	34 23,77	19 13,28	11 7,69	4 2,79	66 46,15	9 6,29	143
R ₂	102 63,75	14 8,75	3 1,87	2 1,25	32 20,00	7 4,37	160
R ₃	82 42,48	24 12,43	5 2,59	2 1,03	62 32,12	18 9,32	193
R ₄	26 19,25	21 15,55	6 4,44	4 2,96	66 48,88	12 8,88	135
R ₅	110 62,85	26 14,85	4 2,28	2 1,14	30 17,14	3 1,71	175
R ₆	81 41,53	22 11,28	11 5,64	0	62 31,79	19 9,74	195

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA IV
BALB/c 5º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
R ₁	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
	19	7	10	6	50	16	108
	17,59	6,48	9,25	5,55	46,29	14,81	
R ₂	24	4	12	6	44	14	104
	23,07	3,84	11,53	5,76	42,30	13,46	
R ₃	15	7	8	10	54	14	108
	13,88	6,48	7,40	9,25	51,92	12,96	
R ₄	8	2	4	8	42	8	72
	11,11	2,77	5,55	11,11	58,33	11,11	
R ₅	15	6	11	10	52	12	106
	14,15	5,66	10,37	9,43	49,05	11,32	
R ₆	20	7	10	10	74	21	142
	14,08	4,92	7,04	7,04	52,11	14,78	

TABLA V
BALB/c 7º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
R ₁	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
	6	5	3	18	84	36	152
	3,94	3,28	1,97	11,84	55,26	23,68	
R ₂	11	6	4	18	104	26	169
	6,50	3,55	2,36	10,65	61,53	15,38	
R ₃	10	3	3	16	96	42	170
	5,88	1,76	1,76	9,41	56,47	24,70	
R ₄	9	2	2	2	24	5	44
	20,45	4,54	4,54	4,54	54,54	11,36	
R ₅	8	1	2	12	64	24	111
	7,20	0,90	1,80	10,81	57,65	21,62	
R ₆	4	0	1	6	46	17	74
	5,40	0	1,35	8,10	62,16	22,97	

O = Órgano

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA VI
BALB/c 10º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L % L	L % L	L % L	L % L	L % L	L % L	L
R ₁	4 4,30	1 1,07	3 3,22	14 15,05	48 51,61	23 24,73	93
R ₂	5 3,16	0	3 1,89	22 13,92	80 50,63	48 30,37	158
R ₃	5 2,59	4 2,07	2 1,03	26 13,47	108 55,95	48 24,87	193
R ₄	2 3,33	0	2 3,33	6 10,00	38 63,33	12 20,00	60
R ₅	7 6,25	2 1,78	3 2,67	12 10,71	50 44,64	38 33,92	112
R ₆	6 3,65	1 0,60	5 3,04	26 15,85	78 47,56	48 29,26	164

TABLA VII
BALB/c 15º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L % L	L % L	L % L	L % L	L % L	L % L	L
R ₁	8 5,59	0	1 0,69	14 9,79	84 58,74	36 25,17	143
R ₂	11 6,54	2 1,19	0	18 10,71	108 64,28	29 17,26	168
R ₃	6 3,82	1 0,63	1 0,63	10 6,36	112 71,33	27 17,19	157
R ₄	7 5,26	0	2 1,50	8 6,01	76 57,14	40 30,07	133
R ₅	9 6,16	0	1 0,68	14 0,58	90 61,64	32 21,91	146
R ₆	7 5,18	1 0,74	1 0,74	10 74,07	88 65,18	28 20,74	135

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA VIII
BALB/c 21º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	0	0	0	8	28	18	54
	0	0	0	14,81	51,85	33,33	
R ₂	1	1	0	8	58	33	101
	0,99	0,99	0	7,92	57,42	32,67	
R ₃	2	0	1	6	38	21	68
	2,94	0	1,47	8,82	55,88	30,88	
R ₄	2	0	0	4	48	34	88
	2,27	0	0	4,54	54,54	38,63	
R ₅	5	1	1	2	52	23	84
	5,95	1,19	1,19	2,38	61,90	27,38	
R ₆	0	0	1	6	22	25	54
	0	0	1,85	11,11	40,74	46,29	

TABLA IX
BALB/c 35º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	5	1	2	8	104	88	208
	2,40	0,48	0,96	3,84	50,00	42,30	
R ₂	0	0	0	16	94	130	240
	0	0	0	6,66	39,16	54,16	
R ₃	3	0	0	12	56	69	140
	2,14	0	0	8,57	40,00	49,28	
R ₄	0	1	0	10	72	86	169
	0	0,59	0	5,91	42,60	50,88	
R ₅	1	1	0	8	92	79	181
	0,55	0,55	0	4,41	50,82	43,64	
R ₆	1	0	0	10	124	121	256
	0,39	0	0	3,90	48,43	47,26	

O = Órgano

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA X
BALB/c 49º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L % L	L % L	L % L	L % L	L % L	L % L	L
R ₁	0 0	0 0	0 0	8 4,23	102 53,96	79 41,79	189
R ₂	2 1,43	0 0	0 0	4 2,87	90 64,74	43 30,93	139
R ₃	0 0	0 0	0 0	4 2,31	90 52,02	79 45,66	173
R ₄	0 0	0 0	0 0	18 7,62	108 45,76	110 46,61	236
R ₅	0 0	0 0	1 0,47	16 7,58	94 44,54	100 47,39	211
R ₆	0 0	0 0	0 0	14 9,45	56 37,83	78 52,70	148

TABLA XI
BALB/c 63º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L % L	L % L	L % L	L % L	L % L	L % L	L
R ₁	1 1,29	1 1,29	1 1,29	10 12,98	24 31,16	40 51,94	77
R ₂	3 2,75	1 0,91	2 1,83	6 5,50	36 33,02	61 55,96	109
R ₃	0 0	0 0	0 0	2 8,69	14 60,86	7 30,43	23
R ₄	2 2,77	1 1,38	1 1,38	4 5,55	30 41,66	34 47,22	72
R ₅	2 1,90	0 0	1 0,95	8 7,61	34 32,38	60 57,14	105
R ₆	3 2,45	1 0,81	1 0,81	0 0	34 27,86	83 68,03	122

O = Órgano

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XII
BALB/c CUADRO RESUMEN

D \ O	HIGADO		PULMONES		VISCERAS		P. TRASERAS		CANAL		CEREBRO	
	$\bar{X} L$	$\bar{X} \% L$	$\bar{X} L$	$\bar{X} \% L$	$\bar{X} L$	$\bar{X} \% L$	$\bar{X} L$	$\bar{X} \% L$	$\bar{X} L$	$\bar{X} \% L$	$\bar{X} L$	$\bar{X} \% L$
2	136,66	93,55	4,83	3,28	0,83	0,54	1,66	1,37	2	1,22	0	0
3	141,83	58,54	48,66	19,70	11	4,40	5,33	2,07	31,33	12,33	8	3,09
4	72,50	42,27	21	12,69	6,66	4,08	2,33	1,52	53	32,68	11,33	6,71
5	16,83	15,64	5,50	5,02	9,16	8,52	8,33	8,02	52,66	50	14,16	13,07
7	8	8,22	2,83	2,33	2,50	2,29	12	9,22	69,66	57,93	25	19,95
10	4,83	3,88	1,33	0,92	3	2,53	17,66	13,16	67	52,28	36,16	27,19
15	8	5,42	0,66	0,42	1	0,70	12,33	8,30	93	63,05	32	22,05
21	1,66	2,02	0,33	0,36	0,50	0,75	5,66	8,26	41	53,72	25,66	34,86
35	1,66	0,91	0,50	0,27	0,33	0,16	10,66	4,95	90,33	45,16	95,50	47,92
49	0,33	0,23	0	0	0,16	0,07	10,66	5,67	90	49,80	81,50	44,18
63	1,83	1,86	0,66	0,73	1	1,04	5	6,72	28,66	37,82	47,50	51,78

O = Organo

D = Días postinoculación

$\bar{X} L$ = Media del número de larvas recuperadas por digestión

$\bar{X} \% L$ = Media del porcentaje de larvas respecto al total recuperado

4.1.1.2.- EN RATONES C57BL/10

TABLA XIII
C57BL/10 2º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L % L	L % L	L % L	L % L	L % L	L % L	L
R ₁	120 99,17	1 0,82	0 0	0 0	0 0	0 0	121
R ₂	117 100	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	117
R ₃	104 100	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	104
R ₄	92 98,92	0 0	1 1,07	0 0	0 0	0 0	93
R ₅	98 95,14	3 2,91	0 0	0 0	2 1,94	0 0	103
R ₆	106 100	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	106

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XIV
C57BL/10 3º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
R ₁	211 91,73	8 3,47	3 1,30	4 1,73	4 1,73	0 0	230
R ₂	218 90,45	14 5,80	3 1,24	0 0	6 2,48	0 0	241
R ₃	87 79,81	17 15,59	1 0,91	0 0	4 3,66	0 0	109
R ₄	286 94,38	10 3,30	1 0,33	2 0,66	4 1,32	0 0	303
R ₅	166 84,69	9 4,59	1 0,51	6 3,06	14 7,14	0 0	196
R ₆	266 96,37	1 0,36	1 0,36	0 0	8 2,89	0 0	276

TABLA XV
C57BL/10 4º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
R ₁	181 90,50	11 5,50	2 1,00	0 0	6 3,00	0 0	200
R ₂	219 85,21	21 8,17	1 0,38	0 0	16 6,22	0 0	257
R ₃	258 87,75	22 8,56	0 0	0 0	14 4,76	0 0	294
R ₄	189 85,13	18 8,10	1 0,45	0 0	14 6,30	0 0	222
R ₅	184 82,51	21 9,41	2 0,89	0 0	16 7,17	0 0	223
R ₆	249 90,87	9 3,28	4 1,45	0 0	12 4,37	0 0	274

O = Órgano

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XVI
C57BL/10 5^a día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	1 2,56	3 7,69	0 0	4 10,25	16 41,02	15 38,46	39
R ₂	3 8,57	0 0	1 2,85	0 0	24 68,57	7 20,00	35
R ₃	15 48,38	3 9,67	2 6,45	0 0	6 19,35	5 16,12	31
R ₄	14 31,81	6 13,63	2 4,54	2 4,54	18 40,90	2 4,54	44
R ₅	41 53,94	12 15,78	1 1,31	0 0	18 23,68	4 5,28	76
R ₆	32 66,66	4 8,33	0 0	0 0	12 25,00	0 0	48

TABLA XVII
C57BL/10 7^a día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	0 0	5 22,72	1 4,54	0 0	16 72,72	0 0	22
R ₂	6 7,14	0 0	5 5,95	16 19,04	48 57,14	9 10,71	84
R ₃	18 19,78	3 3,29	2 2,19	6 6,59	54 59,34	8 8,79	91
R ₄	6 7,79	2 2,59	0 0	14 18,18	48 62,33	7 9,09	77
R ₅	8 17,02	2 4,25	3 6,38	6 12,76	24 51,06	4 8,51	47
R ₆	17 29,31	2 3,44	1 1,72	6 10,34	28 48,27	4 6,89	58

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XVIII
C57BL/10 10º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	13 15,47	3 3,57	2 2,38	10 11,90	44 52,38	12 14,28	84
R ₂	16 20,00	0 0	1 1,25	6 7,50	52 65,00	5 6,25	80
R ₃	10 13,51	1 1,35	0 0	4 5,40	50 67,56	9 12,16	74
R ₄	10 8,84	0 0	3 2,65	4 3,53	80 70,79	16 14,15	113
R ₅	9 14,51	0 0	2 3,22	6 9,67	40 64,51	5 8,06	62
R ₆	8 13,11	1 1,63	1 1,63	4 6,55	44 72,13	3 4,91	61

TABLA XIX
C57BL/10 15º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	11 5,88	0 0	1 0,53	14 7,48	138 73,79	23 12,29	187
R ₂	23 12,77	0 0	1 0,55	18 10,00	114 63,33	24 13,33	180
R ₃	17 11,25	0 0	0 0	10 6,62	100 66,22	24 15,89	151
R ₄	12 6,12	1 0,51	0 0	18 9,18	144 73,46	21 10,71	196
R ₅	15 8,82	0 0	1 0,58	12 7,05	124 72,94	18 10,58	170
R ₆	13 8,12	1 0,62	0 0	14 8,75	108 67,50	24 15,00	160

O = Órgano

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XX
C57BL/10 21º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	3	1	3	8	70	8	93
	3,22	1,07	3,22	8,60	75,26	8,60	
R ₂	5	0	2	8	68	5	88
	5,68	0	2,27	9,09	77,27	5,68	
R ₃	5	1	0	14	40	6	66
	7,57	1,51	0	21,21	60,60	9,09	
R ₄	12	0	0	4	46	2	64
	18,75	0	0	6,25	71,87	3,12	
R ₅	13	0	0	4	36	5	58
	22,41	0	0	6,89	62,06	8,62	
R ₆	11	0	0	6	46	7	70
	15,71	0	0	8,57	65,71	10,00	

TABLA XXI
C57BL/10 35º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	51	1	0	0	76	7	135
	38,05	0,74	0	0	56,29	5,18	
R ₂	61	0	0	18	94	35	208
	29,32	0	0	8,65	45,19	16,82	
R ₃	26	0	0	16	60	22	124
	20,96	0	0	12,90	48,38	17,74	
R ₄	14	0	1	14	42	22	93
	15,05	0	1,07	15,05	45,16	23,65	
R ₅	18	0	1	12	32	12	75
	24,00	0	1,33	16,00	42,66	16,00	
R ₆	23	0	0	18	114	62	217
	10,59	0	0	8,29	52,53	28,57	

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XXII
C57BL/10 49º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	9	0	0	18	72	95	194
	4,63	0	0	9,27	37,11	48,96	
R ₂	3	0	1	26	78	29	137
	2,18	0	0,72	18,97	56,93	21,16	
R ₃	17	0	0	16	58	35	126
	13,49	0	0	12,69	46,03	27,77	
R ₄	12	0	0	8	68	47	135
	8,88	0	0	5,92	50,37	34,81	
R ₅	10	0	0	20	60	44	134
	7,46	0	0	14,92	44,77	32,83	
R ₆	14	0	0	30	118	57	219
	6,39	0	0	13,69	53,88	26,02	

TABLA XXIII
C57BL/10 63º día p.i.

O	HIGADO	PULMONES	VISCERAS	P. TRASERAS	CANAL	CEREBRO	TOTAL
R	L	L	L	L	L	L	L
	% L	% L	% L	% L	% L	% L	
R ₁	13	0	2	6	12	11	44
	29,54	0	4,54	13,63	27,27	25,00	
R ₂	23	0	0	4	4	6	37
	62,16	0	0	10,81	10,81	16,21	
R ₃	25	1	0	4	4	2	36
	69,44	2,77	0	11,11	11,11	5,55	
R ₄	11	0	0	6	30	8	55
	20,00	0	0	10,90	54,54	14,54	
R ₅	11	0	0	4	46	6	67
	16,41	0	0	5,97	68,65	8,95	
R ₆	6	1	0	2	26	4	39
	15,38	2,56	0	5,12	66,66	10,25	

O = Órgano

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XXIV
C57BL/10 CUADRO RESUMEN

D \ O	HIGADO		PULMONES		VISCERAS		P. TRASERAS		CANAL		CEREBRO	
	$\bar{X} L$	$\bar{X} \% L$	$\bar{X} L$	$\bar{X} \% L$	$\bar{X} L$	$\bar{X} \% L$	$\bar{X} L$	$\bar{X} \% L$	$\bar{X} L$	$\bar{X} \% L$	$\bar{X} L$	$\bar{X} \% L$
2	106,16	98,87	0,66	0,62	0,16	0,17	0	0	0,33	0,32	0	0
3	205,66	89,57	9,83	5,51	1,66	0,77	2	0,90	6,66	3,20	0	0
4	213,33	86,99	17	7,17	1,66	0,69	0	0	13	5,30	0	0
5	17,66	35,32	4,66	9,18	1	2,52	1	2,46	15,66	36,42	5,50	14,06
7	9,16	13,50	2,33	6,04	2	3,46	8	11,15	36,33	58,47	5,33	7,33
10	11	14,24	0,83	1,09	1,50	1,85	5,66	7,42	51,66	65,39	8,33	9,96
15	15,16	8,82	0,33	0,18	0,50	0,27	14,33	8,18	121,33	69,54	22,33	12,96
21	8,16	12,22	0,33	0,43	0,83	0,91	7,33	10,10	51	68,79	5,50	7,51
35	32,16	22,99	0,16	0,12	0,33	0,40	13	10,14	69,66	48,36	26,66	17,99
49	10,83	7,17	0	0	0,16	0,12	19,66	12,57	75,66	48,18	51,16	31,92
63	14,83	35,48	0,33	0,88	0,33	0,75	4,33	9,59	20,33	39,84	6,16	13,41

O = Organo

D = Días postinoculación

$\bar{X} L$ = Media del número de larvas recuperadas por digestión

$\bar{X} \% L$ = Media del porcentaje de larvas respecto al total recuperado

4.1.1.3.- TRATAMIENTO ESTADISTICO

Día 2 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	93,553	1,206	6	98,872	1,889	4,587	5,813	0,001	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	3,283	1,652	6	0,622	1,168	3,169	3,222	0,01	SI
<u>- VISCERAS (% L)</u>	6	0,542	0,462	6	0,178	0,437	2,228	1,399	0,05	NO
<u>- M.PATA (% L)</u>	6	1,378	1,666	6	0	0	2,228	2,026	0,05	NO
<u>- CANAL (% L)</u>	6	1,225	1,265	6	0,323	0,792	2,228	1,480	0,05	NO
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	0	0	6	0	0	2,228	0	0,05	NO
<u>- TOTAL (L)</u>	6	146,000	27,878	6	107,833	10,172	3,169	3,192	0,01	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 3 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	58,547	13,064	6	89,572	6,227	4,587	5,251	0,001	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	19,708	2,997	6	5,518	5,256	4,587	5,745	0,001	SI
<u>- VISCERAS (% L)</u>	6	4,407	1,489	6	0,775	0,436	4,587	5,734	0,001	SI
<u>- M.PATA (% L)</u>	6	2,073	0,991	6	0,908	1,252	2,228	1,787	0,05	NO
<u>- CANAL (% L)</u>	6	12,138	8,379	6	3,203	2,100	2,228	2,534	0,05	SI
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	3,092	2,303	6	0	0	3,169	3,289	0,01	SI
<u>- TOTAL (L)</u>	6	246,167	36,565	6	225,833	68,204	2,228	4,250	0,05	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 4 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	n	\bar{x}	D.S.	n	\bar{x}	D.S.	"t" teór.	"t" real	P <	Sig.
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	42,272	18,749	6	86,995	3,306	4,587	5,754	0,001	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	12,69	2,481	6	7,17	2,312	3,581	3,987	0,005	SI
- <u>VISCERAS (% L)</u>	6	4,085	2,278	6	0,695	0,518	3,169	3,555	0,01	SI
- <u>M. PATA (% L)</u>	6	1,528	1,136	6	0	0	3,169	3,295	0,01	SI
- <u>CANAL (% L)</u>	6	32,68	13,017	6	5,337	1,586	4,587	5,107	0,001	SI
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	6,718	3,205	6	0	0	4,587	5,135	0,001	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	6	166,833	25,191	6	245	35,844	3,581	4,370	0,005	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 5 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	15,647	4,178	6	35,32	25,693	2,228	1,851	0,05	NO
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	5,025	1,492	6	9,183	5,492	2,228	1,790	0,05	NO
- <u>VISCERAS (% L)</u>	6	8,523	2,249	6	2,525	2,600	3,581	4,274	0,005	SI
- <u>M.PATA (% L)</u>	6	8,023	2,246	6	2,465	4,224	2,228	2,846	0,05	SI
- <u>CANAL (% L)</u>	6	50	5,504	6	36,42	18,215	2,228	1,748	0,05	NO
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	13,073	1,614	6	14,063	14,147	2,228	0,170	0,05	NO
- <u>TOTAL (L)</u>	6	106,667	22,187	6	45,5	16,133	4,587	5,462	0,001	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 7 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{X}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{X}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	8,228	6,088	6	13,507	10,556	2,228	1,061	0,05	NO
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	2,338	1,736	6	6,048	8,296	2,228	1,072	0,05	NO
- <u>VISCERAS (% L)</u>	6	2,297	1,147	6	3,463	2,550	2,228	1,022	0,05	NO
- <u>M.PATA (% L)</u>	6	9,225	2,632	6	11,152	7,212	2,228	0,615	0,05	NO
- <u>CANAL (% L)</u>	6	57,935	3,215	6	58,477	8,711	2,228	0,143	0,05	NO
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	19,952	5,349	6	7,332	3,794	3,581	4,714	0,001	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	6	120	52,722	6	63,167	26,011	2,228	2,368	0,05	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{X} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 10 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	3,88	1,291	6	14,24	3,626	4,587	6,593	0,001	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	0,92	0,881	6	1,092	1,419	2,228	0,252	0,05	NO
- <u>VISCERAS (% L)</u>	6	2,53	0,901	6	1,855	1,151	2,228	1,131	0,05	NO
- <u>M. PATA (% L)</u>	6	13,167	2,344	6	7,425	3,004	3,581	3,691	0,005	SI
- <u>CANAL (% L)</u>	6	52,287	6,624	6	65,395	7,064	3,169	3,316	0,01	SI
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	27,192	4,956	6	9,968	4,097	4,587	6,561	0,001	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	6	130	50,004	6	79	19,079	2,228	2,334	0,05	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 15 p.i.

	<u>BALE/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	5,425	0,946	6	8,827	2,754	2,228	2,861	0,05	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	0,427	0,504	6	0,188	0,294	2,228	1,001	0,05	NO
<u>- VISCERAS (% L)</u>	6	0,707	0,477	6	0,277	0,303	2,228	1,864	0,05	NO
<u>- M.PATA (% L)</u>	6	8,308	1,974	6	8,18	1,330	2,228	0,132	0,05	NO
<u>- CANAL (% L)</u>	6	63,052	5,101	6	69,54	4,444	2,228	2,349	0,05	SI
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	22,057	4,947	6	12,967	2,194	3,581	4,115	0,005	SI
<u>- TOTAL (L)</u>	6	147	13,402	6	174	16,912	2,228	3,065	0,05	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 21 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	2,025	2,262	6	12,223	7,798	2,228	3,077	0,05	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	0,363	0,566	6	0,43	0,681	2,228	0,184	0,05	NO
- <u>VISCERAS (% L)</u>	6	0,752	0,850	6	0,915	1,449	2,228	0,238	0,05	NO
- <u>M.PATA (% L)</u>	6	8,263	4,469	6	10,102	5,553	2,228	0,632	0,05	NO
- <u>CANAL (% L)</u>	6	53,722	7,182	6	68,795	7,002	3,581	3,681	0,005	SI
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	34,863	6,690	6	7,518	2,598	4,587	9,333	0,001	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	6	74,833	19,271	6	73,167	14,063	2,228	0,171	0,05	NO

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 35 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	0,913	1,076	6	22,995	9,888	4,587	5,438	0,001	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	0,27	0,298	6	0,123	0,302	2,228	0,847	0,05	NO
<u>- VISCERAS (% L)</u>	6	0,16	0,392	6	0,4	0,625	2,228	0,797	0,05	NO
<u>- M.PATA (% L)</u>	6	5,548	1,867	6	10,148	5,908	2,228	1,819	0,05	NO
<u>- CANAL (% L)</u>	6	45,168	5,203	6	48,368	5,159	2,228	1,070	0,05	NO
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	47,92	4,470	6	17,993	7,918	4,587	8,062	0,001	SI
<u>- TOTAL (L)</u>	6	199	44,082	6	142	58,727	2,228	1,901	0,05	NO

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 49 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	0,238	0,584	6	7,172	3,871	3,581	4,339	0,005	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	0	0	6	0	0	2,228	0	0,05	NO
- <u>VISCERAS (% L)</u>	6	0,078	0,192	6	0,12	0,294	2,228	0,291	0,05	NO
- <u>M.PATA (% L)</u>	6	5,677	2,931	6	1,577	4,536	2,228	3,130	0,05	SI
- <u>CANAL (% L)</u>	6	49,808	9,303	6	48,182	7,108	2,228	0,340	0,05	NO
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	44,18	7,379	6	31,925	9,668	2,228	2,468	0,05	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	6	182,667	37,120	6	157,5	38,95	2,228	1,146	0,05	NO

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 63 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	1,86	1,073	6	35,488	24,115	3,169	3,412	0,01	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	0,732	0,607	6	0,888	1,378	2,228	0,255	0,05	NO
- <u>VISCERAS (% L)</u>	6	1,043	0,624	6	0,757	1,853	2,228	0,359	0,05	NO
- <u>M. PATA (% L)</u>	6	6,722	4,287	6	9,59	3,314	2,228	1,297	0,05	NO
- <u>CANAL (% L)</u>	6	37,823	12,180	6	39,84	26,801	2,228	0,168	0,05	NO
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	51,787	12,545	6	13,417	6,574	4,587	6,574	0,001	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	6	84,667	35,837	6	46,333	2,478	2,228	2,478	0,05	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

4.1.1.4.- REPRESENTACION CONJUNTA DE LA DINAMICA MIGRATORIA EN AMBAS CEPAS

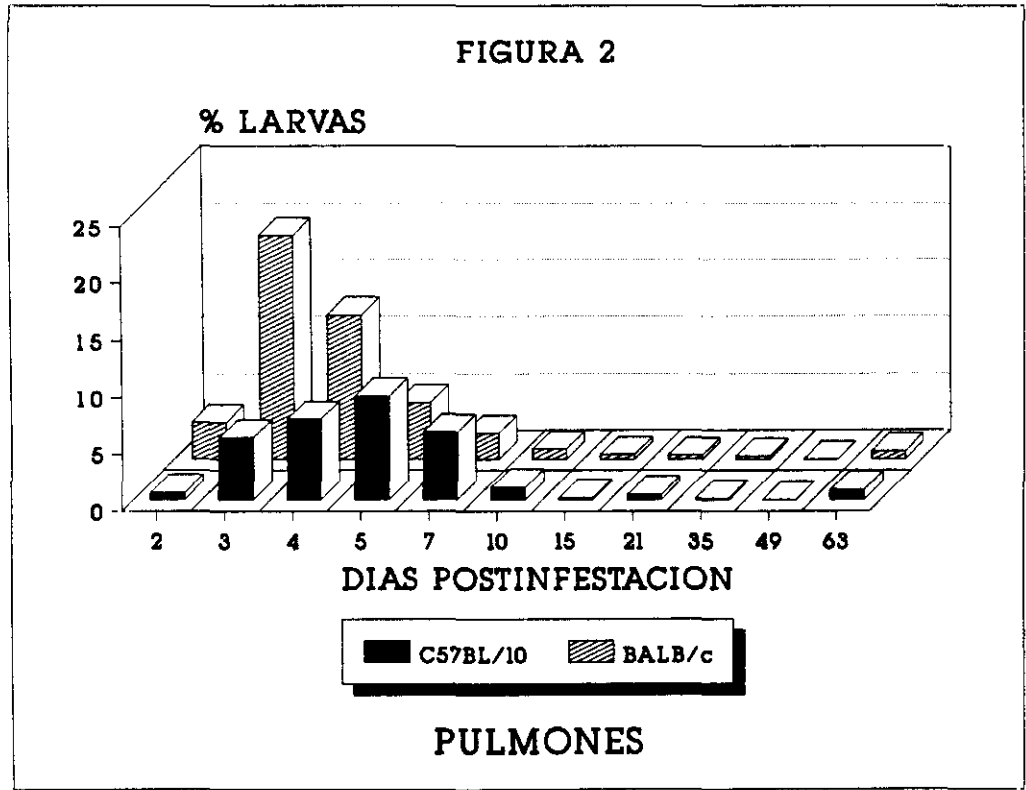
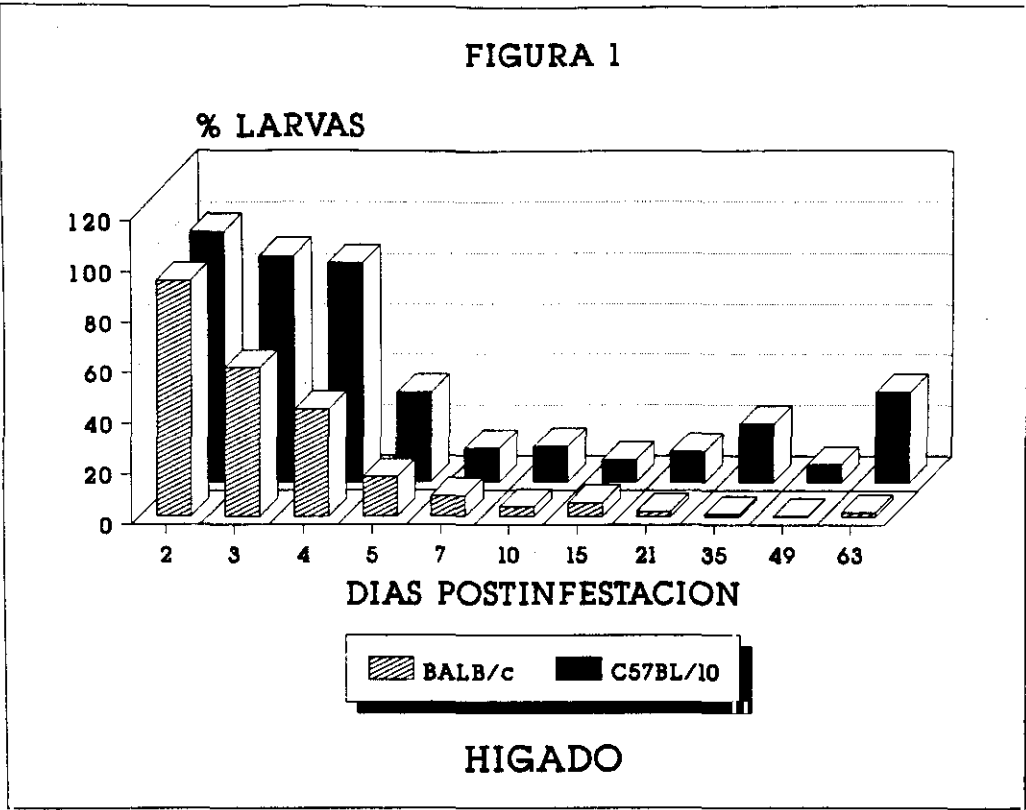


FIGURA 3

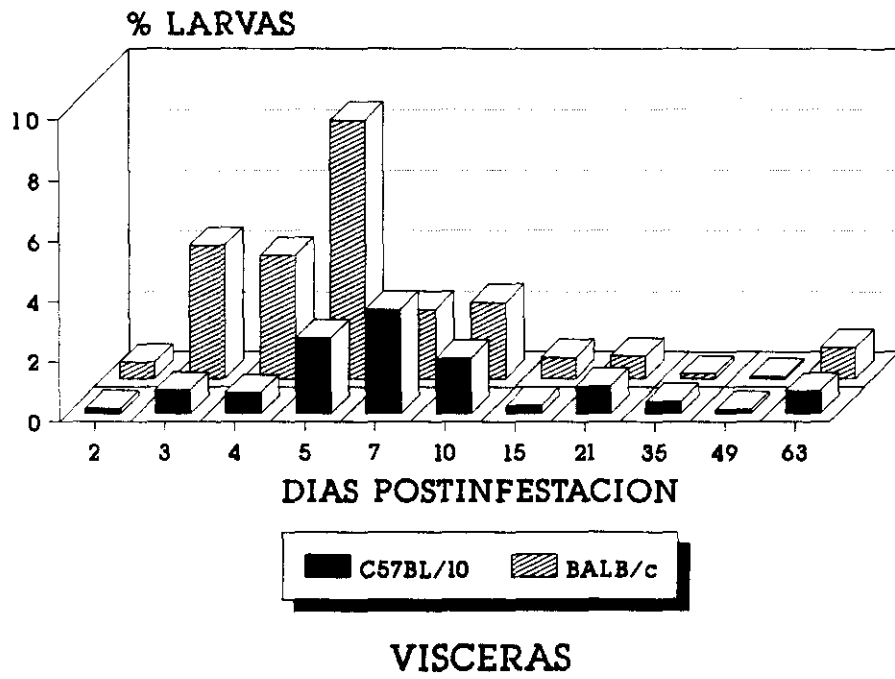


FIGURA 4

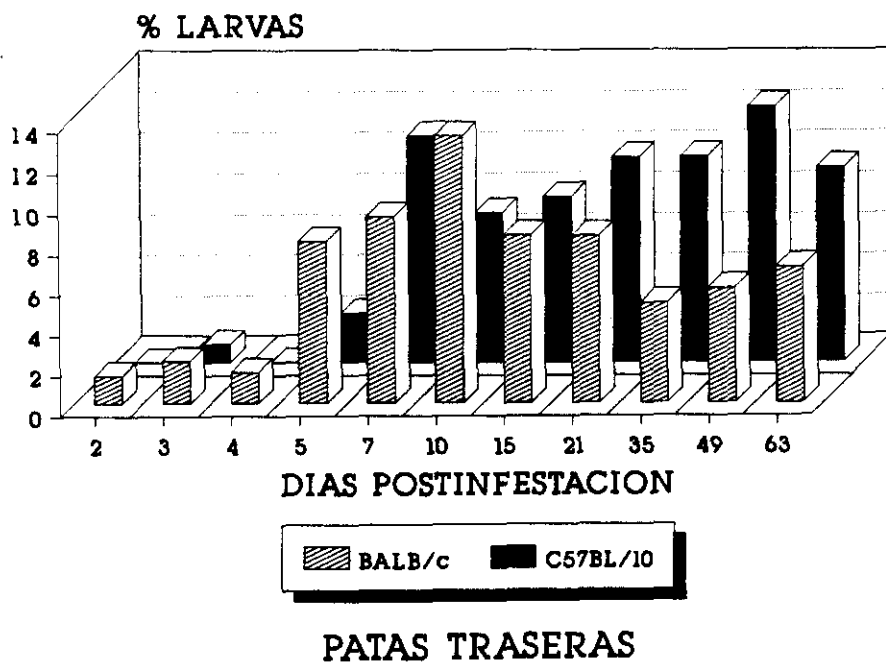


FIGURA 5

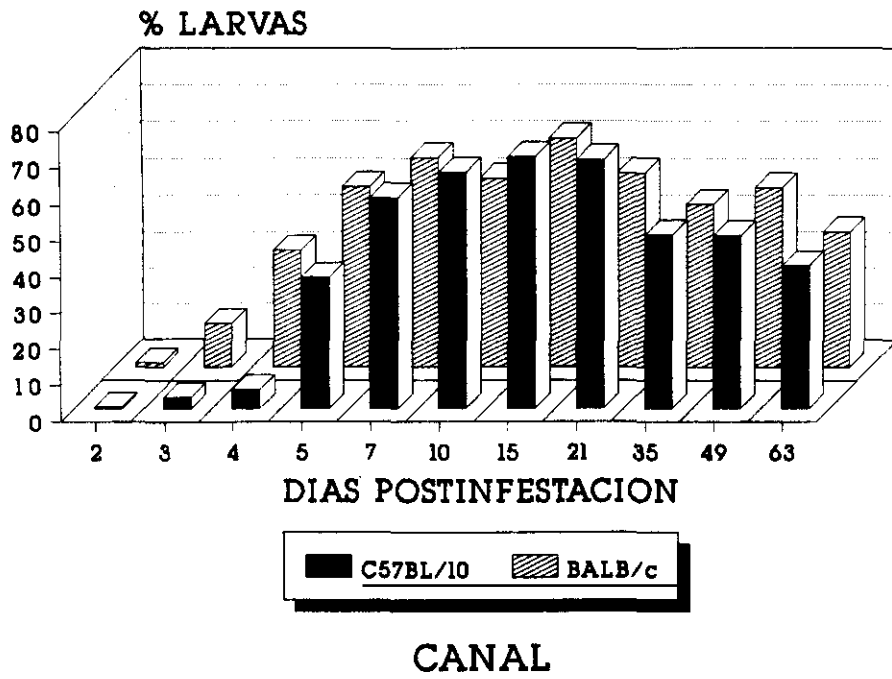
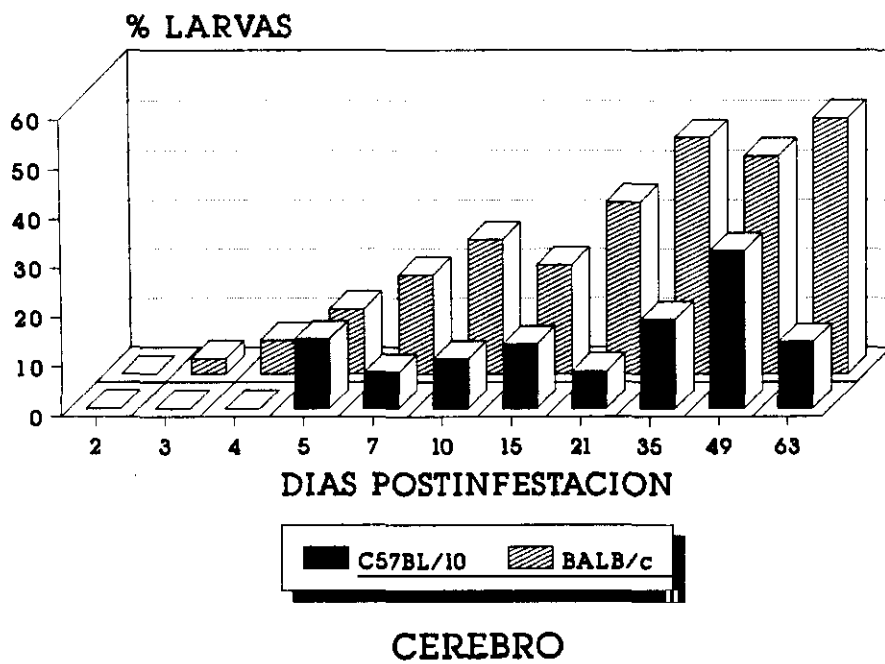


FIGURA 6



4.1.2.- SELECCION DE ORGANOS MAS REPRESENTATIVOS

4.1.2.1.- EN RATONES BALB/c

TABLA XXV
BALB/c 2º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	172	94,50	8	4,39	2	1,09	0	0	182
R ₂	162	94,18	4	2,32	6	3,48	0	0	172
R ₃	112	98,24	2	1,75	0	0	0	0	114
R ₄	129	96,99	2	1,50	2	1,50	0	0	133
R ₅	139	93,91	7	4,72	2	1,35	0	0	148
R ₆	106	94,64	6	5,35	0	0	0	0	112

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XXVI
BALB/c 3º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	98	42,06	48	20,60	68	29,18	19	8,15	233
R ₂	130	70,27	41	22,16	12	6,48	2	1,08	185
R ₃	158	61,00	47	18,14	46	17,76	8	3,08	259
R ₄	142	71,35	39	19,59	14	7,03	4	2,01	199
R ₅	180	75,31	45	18,82	10	4,18	4	1,67	239
R ₆	143	54,16	72	27,27	38	14,39	11	4,16	264

TABLA XXVII
BALB/c 4º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	34	26,56	19	14,84	66	51,56	9	7,03	128
R ₂	102	65,80	14	9,03	32	20,64	7	4,51	155
R ₃	82	44,08	24	12,90	62	33,33	18	9,67	186
R ₄	26	20,80	21	16,80	66	52,80	12	9,60	125
R ₅	110	65,08	26	15,38	30	17,75	3	1,77	169
R ₆	81	44,02	22	11,95	62	33,69	19	10,32	184

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XXVIII
BALB/c 5º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	19	20,65	7	7,60	50	54,34	16	17,39	92
R ₂	24	27,90	4	4,65	44	51,16	14	16,27	86
R ₃	15	16,66	7	7,77	54	60,00	14	15,55	90
R ₄	8	13,33	2	3,33	42	70,00	8	13,33	60
R ₅	15	17,64	6	7,05	52	61,17	12	14,11	85
R ₆	20	16,39	7	5,73	74	60,65	21	17,21	122

TABLA XXIX
BALB/c 7º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	6	4,58	5	3,81	84	64,12	36	27,48	131
R ₂	11	7,48	6	4,08	104	70,74	26	17,68	147
R ₃	10	6,62	3	1,98	96	63,57	42	27,81	151
R ₄	9	22,50	2	5,00	24	60,00	5	12,50	40
R ₅	8	8,24	1	1,03	64	65,97	24	24,74	97
R ₆	4	5,97	0	0	46	68,65	17	25,37	67

O = Órgano

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XXX
BALB/c 10º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L
R ₁	4	5,26	1	1,31	48	63,15	23	30,26	76
R ₂	5	3,75	0	0	80	60,15	48	36,09	133
R ₃	5	3,03	4	2,42	108	65,45	48	29,09	165
R ₄	2	3,84	0	0	38	73,07	12	23,07	52
R ₅	7	7,21	2	2,06	50	51,54	38	39,17	97
R ₆	6	4,51	1	0,75	78	58,64	48	36,09	133

TABLA XXXI
BALB/c 15º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L
R ₁	8	6,25	0	0	84	65,62	36	28,12	128
R ₂	11	7,33	2	1,33	108	72,00	29	19,33	150
R ₃	6	4,10	1	0,68	112	76,71	27	18,49	146
R ₄	7	5,69	0	0	76	61,78	40	32,52	123
R ₅	9	6,87	0	0	90	68,70	32	24,42	131
R ₆	7	5,64	1	0,80	88	70,96	28	22,58	124

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XXXII
BALB/c 21º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	0	0	0	0	28	60,86	18	39,13	46
R ₂	1	1,07	1	1,07	58	62,36	33	35,48	93
R ₃	2	3,27	0	0	38	62,29	21	34,42	61
R ₄	2	2,38	0	0	48	57,14	34	40,47	84
R ₅	5	6,17	1	1,23	52	64,19	23	28,39	81
R ₆	0	0	0	0	22	46,80	25	53,19	47

TABLA XXXIII
BALB/c 35º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	5	2,52	1	0,50	104	52,52	88	44,44	198
R ₂	0	0	0	0	94	41,96	130	58,03	224
R ₃	3	2,34	0	0	56	43,75	69	53,90	128
R ₄	0	0	1	0,62	72	45,28	86	54,08	159
R ₅	1	0,57	1	0,57	92	53,17	79	45,66	173
R ₆	1	0,40	0	0	124	50,40	121	49,18	246

O = Órgano

R = ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XXXIV
BALB/c 49º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L
R ₁	0	0	0	0	102	56,35	79	43,64	181
R ₂	2	1,48	0	0	90	66,66	43	31,85	135
R ₃	0	0	0	0	90	53,25	79	46,74	169
R ₄	0	0	0	0	108	49,54	110	50,45	218
R ₅	0	0	0	0	94	48,45	100	51,54	194
R ₆	0	0	0	0	56	41,79	78	58,20	134

TABLA XXXV
BALB/c 63º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L
R ₁	1	1,51	1	1,51	24	36,36	40	60,60	66
R ₂	3	2,97	1	0,99	36	35,64	61	60,39	101
R ₃	0	0	0	0	14	66,66	7	33,33	21
R ₄	2	2,98	1	1,49	30	44,77	34	50,74	67
R ₅	2	2,08	0	0	34	35,41	60	62,50	96
R ₆	3	2,47	1	0,82	34	28,09	83	68,59	121

O = Órgano

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XXXVI
BALB/c CUADRO RESUMEN

O D	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO	
	\bar{X} L	\bar{X} %L	\bar{X} L	\bar{X} %L	\bar{X} L	\bar{X} %L	\bar{X} L	\bar{X} %L
2	136,66	95,41	4,83	3,33	2	1,23	0	0
3	141,83	62,35	48,66	21,09	31,33	13,17	8	3,35
4	72,50	44,39	21	13,48	53	34,96	11,33	7,15
5	16,83	18,76	5,50	6,02	52,66	59,55	14,16	15,64
7	8	9,23	2,83	2,65	69,66	65,50	25	22,59
10	4,83	4,60	1,33	1,09	67	62	36,16	32,29
15	8	5,98	0,66	0,46	93	69,29	32	24,24
21	1,66	2,14	0,33	0,38	41	58,94	25,66	38,51
35	1,66	0,97	0,50	0,28	90,33	47,84	95,50	50,88
49	0,33	0,24	0	0	90	52,67	81,50	47,07
63	1,83	2	0,66	0,80	28,66	41,15	47,50	56,02

O = Organo

D = Días postinoculación

\bar{X} L = Media del número de larvas recuperadas por digestión

% \bar{X} L = Media del porcentaje de larvas respecto al total recuperado

4.1.2.2.- EN RATONES C57BL/10

TABLA XXXVII
C57BL/10 2º día p.i.

R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	120	99,17	1	0,82	0	0	0	0	121
R ₂	117	100	0	0	0	0	0	0	117
R ₃	104	100	0	0	0	0	0	0	104
R ₄	92	100	0	0	0	0	0	0	92
R ₅	98	95,14	3	2,91	2	1,94	0	0	103
R ₆	106	100	0	0	0	0	0	0	106

O = Organo

R = ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XXXVIII
C57BL/10 3º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L
R ₁	211	94,61	8	3,58	4	1,79	0	0	223
R ₂	218	91,59	14	5,88	6	2,52	0	0	238
R ₃	87	80,55	17	15,74	4	3,70	0	0	108
R ₄	286	95,33	10	3,33	4	1,33	0	0	300
R ₅	166	87,83	9	4,76	14	7,40	0	0	189
R ₆	266	96,72	1	0,36	8	2,90	0	0	275

TABLA XXIX
C57BL/10 4º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L
R ₁	181	91,41	11	5,55	6	3,03	0	0	198
R ₂	219	85,54	21	8,20	16	6,25	0	0	256
R ₃	258	87,75	22	7,48	14	4,76	0	0	294
R ₄	189	85,52	18	8,14	14	6,33	0	0	221
R ₅	184	83,25	21	9,50	16	7,23	0	0	221
R ₆	249	92,22	9	3,33	12	4,44	0	0	270

O = Órgano

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XL
C57BL/10 5º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	1	2,85	3	8,57	16	45,71	15	42,85	35
R ₂	3	8,82	0	0	24	70,58	7	20,58	34
R ₃	15	51,72	3	10,34	6	20,68	5	17,24	29
R ₄	14	35,00	6	15,00	18	45,00	2	5,00	40
R ₅	41	54,66	12	16,00	18	24,00	4	5,33	75
R ₆	32	66,66	4	8,33	12	25,00	0	0	48

TABLA XLI
C57BL/10 7º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	0	0	5	23,80	16	76,19	0	0	21
R ₂	6	9,52	0	0	48	76,19	9	14,28	63
R ₃	18	21,68	3	3,61	54	65,06	8	9,63	83
R ₄	6	9,52	2	3,17	48	76,19	7	11,11	63
R ₅	8	21,05	2	5,26	24	63,15	4	10,52	38
R ₆	17	33,33	2	3,92	28	54,80	4	7,84	51

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XLII
C57BL/10 10º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L
R ₁	13	18,05	3	4,16	44	61,11	12	16,66	72
R ₂	16	21,91	0	0	52	71,23	5	6,84	73
R ₃	10	14,28	1	1,42	50	71,42	9	12,85	70
R ₄	10	9,43	0	0	80	75,47	16	15,09	106
R ₅	9	16,66	0	0	40	74,07	5	9,25	54
R ₆	8	14,28	1	1,78	44	78,57	3	5,35	56

TABLA XLIII
C57BL/10 15º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L
R ₁	11	6,39	0	0	138	80,23	23	13,37	172
R ₂	23	14,28	0	0	114	70,80	24	14,90	161
R ₃	17	12,05	0	0	100	70,92	24	17,02	141
R ₄	12	6,74	1	0,56	144	80,89	21	11,79	178
R ₅	15	9,55	0	0	124	78,88	18	11,46	157
R ₆	13	8,90	1	0,68	108	73,97	24	16,43	146

O = Órgano

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XLIV
C57BL/10 21º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L
R ₁	3	3,65	1	1,21	70	85,36	8	9,75	82
R ₂	5	6,41	0	0	68	87,17	5	6,41	78
R ₃	5	9,61	1	1,92	40	76,92	6	11,53	52
R ₄	12	20,00	0	0	46	76,66	2	3,33	60
R ₅	13	24,07	0	0	36	66,66	5	9,25	54
R ₆	11	17,18	0	0	46	71,87	7	10,93	64

TABLA XLV
C57BL/10 35º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L	% L.	L
R ₁	51	37,77	1	0,74	76	56,29	7	5,18	135
R ₂	61	32,10	0	0	94	49,47	35	18,42	190
R ₃	26	24,07	0	0	60	55,55	22	20,37	108
R ₄	14	17,94	0	0	42	53,84	22	28,20	78
R ₅	18	29,03	0	0	32	51,61	12	19,35	62
R ₆	23	11,55	0	0	114	57,28	62	31,15	199

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XLVI
C57BL/10 49º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	9	5,11	0	0	72	40,90	95	53,97	176
R ₂	3	2,72	0	0	78	70,90	29	26,36	110
R ₃	17	15,45	0	0	58	52,72	35	31,81	110
R ₄	12	9,44	0	0	68	53,54	47	37,00	127
R ₅	10	8,77	0	0	80	52,63	44	38,59	114
R ₆	14	7,40	0	0	118	62,43	57	30,15	189

TABLA XLVII
C57BL/10 63 día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	13	36,11	0	0	12	33,33	11	30,55	36
R ₂	23	69,69	0	0	4	12,12	6	18,18	33
R ₃	25	78,12	1	3,12	4	12,50	2	6,25	32
R ₄	11	22,44	0	0	30	61,22	8	16,32	49
R ₅	11	17,46	0	0	46	73,01	6	9,52	63
R ₆	6	16,21	1	2,70	26	70,27	4	10,81	37

O = Órgano

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

TABLA XLVIII
C57BL/10 CUADRO RESUMEN

O D	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO	
	\bar{X} L	\bar{X} %L	\bar{X} L	\bar{X} %L	\bar{X} L	\bar{X} %L	\bar{X} L	\bar{X} %L
2	106,16	99,05	0,66	0,62	0,33	0,32	0	0
3	205,66	91,10	9,83	5,60	6,66	3,27	0	0
4	213,33	87,61	17	7,03	13	5,34	0	0
5	17,66	36,61	4,66	9,70	15,66	38,49	5,50	15,16
7	9,16	15,85	2,33	6,62	36,33	68,61	5,33	8,89
10	11	15,76	0,83	1,22	51,66	71,97	8,33	11
15	15,16	9,65	0,33	0,20	121,33	75,96	22,33	14,16
21	8,16	13,48	0,33	0,52	51	77,44	5,50	8,53
35	32,16	25,41	0,16	0,12	69,66	54	26,66	20,44
49	10,83	8,14	0	0	75,66	55,52	51,16	36,31
63	14,83	40	0,33	0,97	20,33	43,74	6,16	15,27

O = Organo

D = Días postinoculación

\bar{X} L = Media del número de larvas recuperadas por digestión

\bar{X} % L = Media del porcentaje de larvas respecto al total recuperado

4.1.2.3.- TRATAMIENTO ESTADISTICO

Día 2 p.i.

	<u>BALE/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	95,41	1,772	6	99,052	1,945	3,581	3,391	0,005	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	3,338	1,673	6	0,622	1,168	3,169	3,261	0,01	SI
<u>- CANAL (% L)</u>	6	1,237	1,280	6	0,323	0,792	2,228	1,486	0,05	NO
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	0	0	6	0	0	2,228	0	0,05	NO
<u>- TOTAL (L)</u>	6	143,5	29,283	6	107,167	10,458	2,228	2,862	0,05	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 3 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	62,358	12,588	6	91,105	6,067	4,587	5,039	0,001	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	21,097	3,337	6	5,608	5,297	4,587	6,060	0,001	SI
- <u>CANAL (% L)</u>	6	13,17	9,404	6	3,273	2,186	2,228	2,511	0,05	SI
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	3,358	2,590	6	0	0	3,169	3,176	0,01	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	6	229,833	31,852	6	222,167	68,169	2,228	0,250	0,05	NO

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 4 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	44,39	18,768	6	87,615	3,560	4,587	5,543	0,001	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	13,483	2,791	6	7,033	2,226	3,581	4,425	0,005	SI
<u>- CANAL (% L)</u>	6	34,962	14,828	6	5,34	1,540	4,587	4,867	0,001	SI
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	7,15	3,416	6	0	0	4,587	5,128	0,001	SI
<u>- TOTAL (L)</u>	6	157,833	26,754	6	243,333	36,032	4,587	4,667	0,01	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 5 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	18,762	5,057	6	36,618	25,968	2,228	1,653	0,05	NO
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	6,022	1,779	6	9,707	5,752	2,228	1,499	0,05	NO
<u>- CANAL (% L)</u>	6	59,553	6,493	6	38,495	19,149	2,228	2,551	0,05	SI
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	15,643	1,650	6	15,167	15,685	2,228	0,074	0,05	NO
<u>- TOTAL (L)</u>	6	89,167	19,823	6	43,5	16,718	3,581	4,314	0,005	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 7 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	9,232	6,621	6	15,85	11,815	2,228	1,197	0,05	NO
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	2,65	1,950	6	6,627	8,592	2,228	1,506	0,05	NO
<u>- CANAL (% L)</u>	6	65,508	3,834	6	68,613	8,975	2,228	0,779	0,05	NO
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	22,597	6,155	6	8,897	4,644	3,581	4,284	0,005	SI
<u>- TOTAL (L)</u>	6	105,5	45,360	6	53,167	21,693	2,228	2,550	0,05	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 10 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	4,6	1,485	6	15,768	4,203	4,587	6,137	0,001	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	1,09	1,025	6	1,227	1,641	2,228	0,173	0,05	NO
<u>- CANAL (% L)</u>	6	62	7,210	6	71,978	5,983	2,228	2,609	0,05	SI
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	32,295	5,926	6	11,007	4,571	4,587	6,967	0,001	SI
<u>- TOTAL (L)</u>	6	109,333	41,879	6	71,833	18,659	2,228	2,003	0,05	NO

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 15 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	5,98	1,133	6	9,652	3,062	2,228	2,755	0,05	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	0,468	0,558	6	0,207	0,322	2,228	0,995	0,05	NO
<u>- CANAL (% L)</u>	6	69,295	5,204	6	75,965	4,640	2,228	2,343	0,05	SI
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	24,243	5,359	6	14,162	2,234	3,581	4,223	0,005	SI
<u>- TOTAL (L)</u>	6	133,667	11,536	6	159,167	14,359	3,169	3,391	0,01	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 21 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	2,148	2,361	6	13,487	8,123	3,169	3,283	0,01	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	0,383	0,596	6	5,212	0,839	2,228	0,329	0,05	NO
<u>- CANAL (% L)</u>	6	58,94	6,400	6	77,44	7,817	3,581	4,486	0,005	SI
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	38,513	8,343	6	8,533	3,108	4,587	8,248	0,001	SI
<u>- TOTAL (L)</u>	6	68,667	20,106	6	65	12,442	2,228	0,380	0,05	NO

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 35 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	0,972	1,153	6	25,41	9,595	4,587	6,194	0,001	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	0,282	0,311	6	0,123	0,302	2,228	0,895	0,05	NO
- <u>CANAL (% L)</u>	6	47,847	4,79	6	54,007	2,289	2,228	2,673	0,05	SI
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	50,882	5,331	6	20,445	9,089	4,587	7,075	0,001	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	6	188	43,419	6	128,667	56,899	2,228	2,031	0,05	NO

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Día 49 p.i.

	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	n	\bar{x}	D.S.	n	\bar{x}	D.S.	"t" teór.	"t" real	P <	Sig.
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	0,247	0,604	6	8,148	4,350	3,581	4,407	0,005	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	0	0	6	0	0	2,228	0	0,05	NO
<u>- CANAL (% L)</u>	6	52,673	8,433	6	55,52	10,180	2,228	0,527	0,05	NO
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	47,073	8,931	6	36,313	9,744	2,228	1,993	0,05	NO
<u>- TOTAL (L)</u>	6	171,833	33,175	6	137,667	35,523	2,228	1,722	0,05	NO

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

	<u>8ALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	2,002	1,129	6	40,005	27,321	3,169	3,404	0,01	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	0,802	0,678	6	0,97	1,509	2,228	0,249	0,05	NO
- <u>CANAL (% L)</u>	6	41,155	13,570	6	43,742	28,108	2,228	0,203	0,05	NO
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	56,025	12,512	6	15,272	8,688	4,587	6,553	0,001	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	6	78,667	35,252	6	41,667	12,094	2,228	2,432	0,05	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

4.1.2.4.- REPRESENTACION CONJUNTA DE LA DINAMICA MIGRATORIA EN AMBAS CEPAS

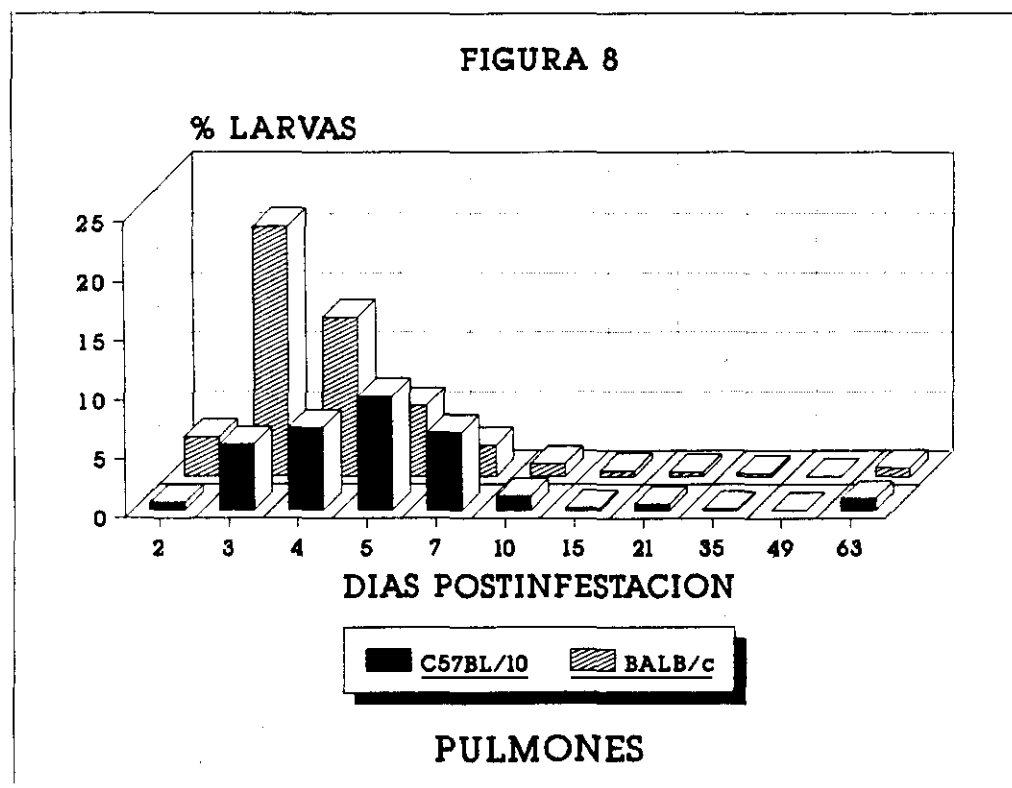
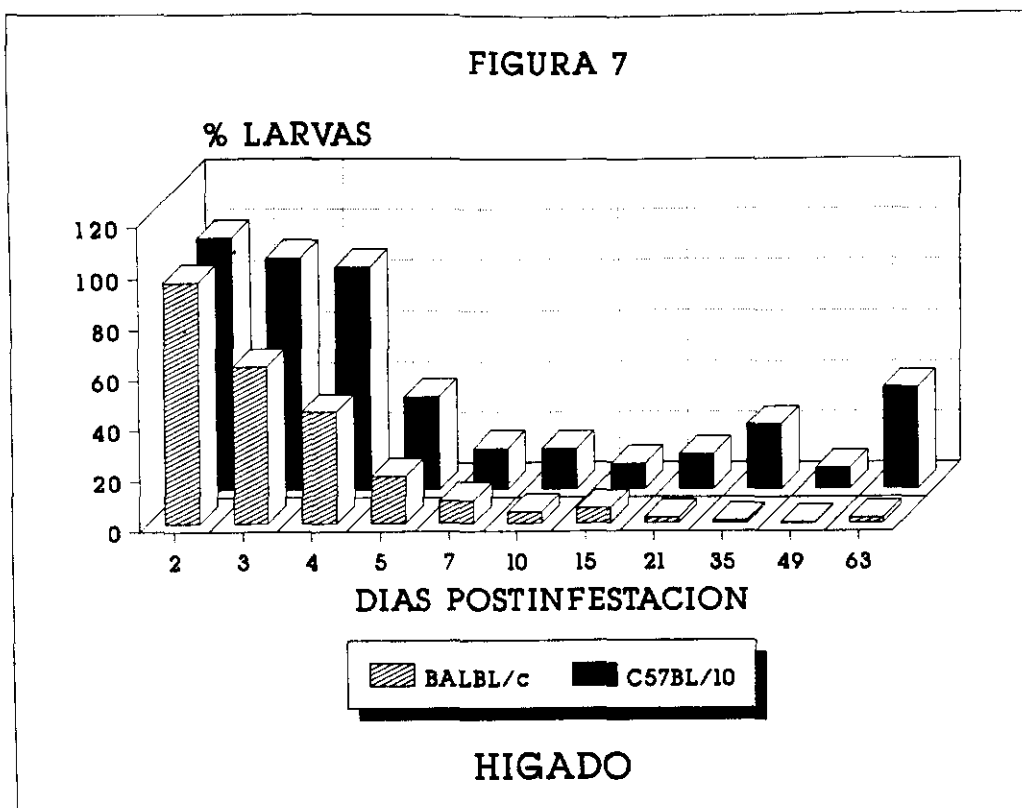


FIGURA 9

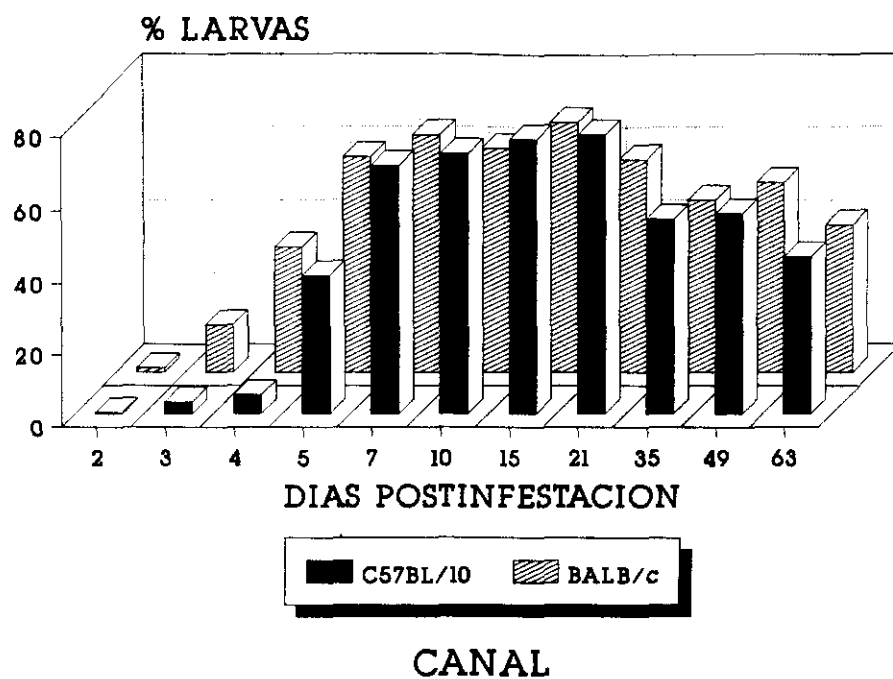


FIGURA 10

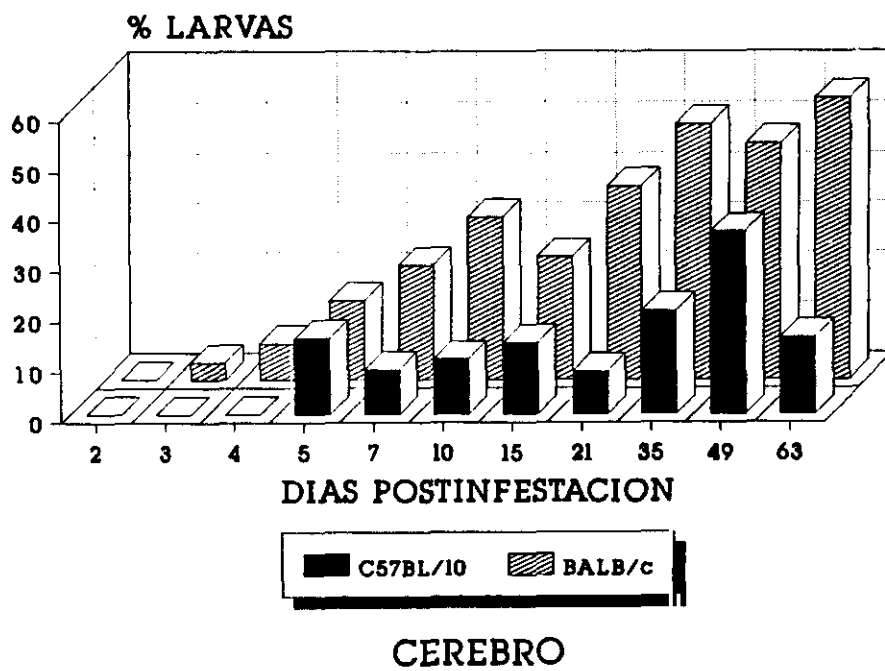


FIGURA 11
Ratones BALB/c

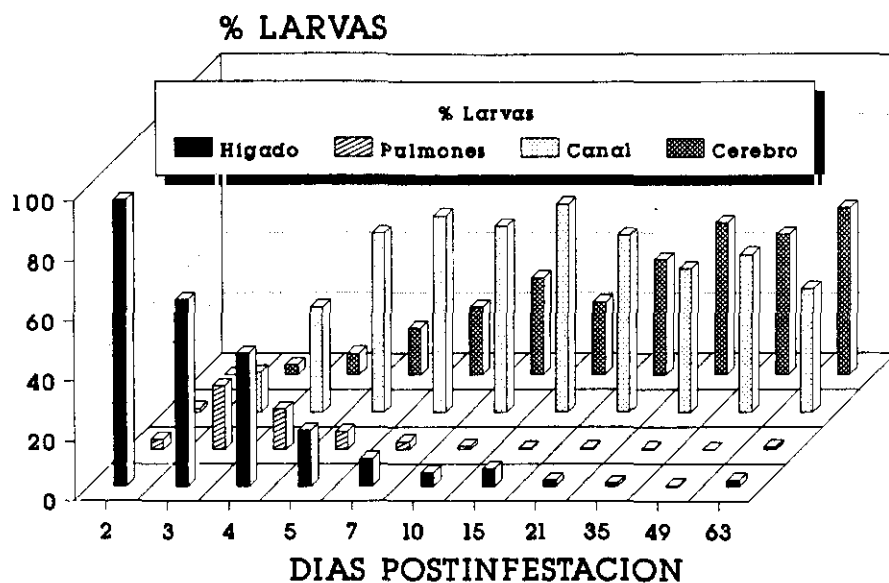
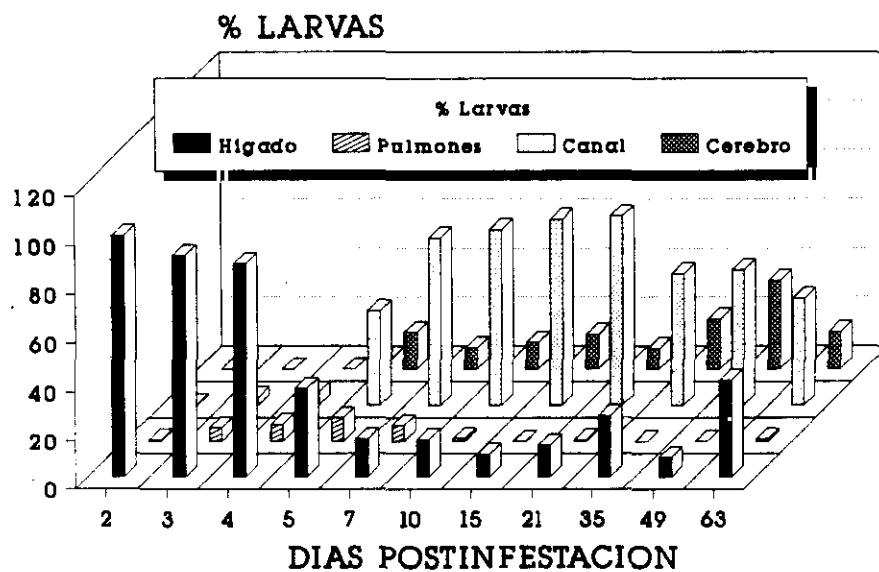


FIGURA 12
Ratones C57BL/10



4.1.2.5.- AMPLIACION CRONOLOGICA DEL ESTUDIO DE MIGRACION LARVARIA EN LA
CEPA BALB/c

TABLA XLIX
BALB/c 63º día p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	1	1,51	1	1,51	24	36,36	40	60,60	66
R ₂	3	2,97	1	0,99	36	35,64	61	60,39	101
R ₃	0	0	0	0	14	66,66	7	33,33	21
R ₄	2	2,98	1	1,49	30	44,77	34	50,74	67
R ₅	2	2,08	0	0	34	35,41	60	62,50	96
R ₆	3	2,47	1	0,82	34	28,09	83	68,59	121

TABLA L
BALB/c 1 año p.i.

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	1	2,94	0	0	10	29,41	23	67,74	34
R ₂	0	0	0	0	8	26,66	22	73,33	30
R ₃	2	8	0	0	8	32	15	60	25
R ₄	0	0	0	0	6	23,07	20	76,92	26
R ₅	0	0	0	0	12	40	18	60	30

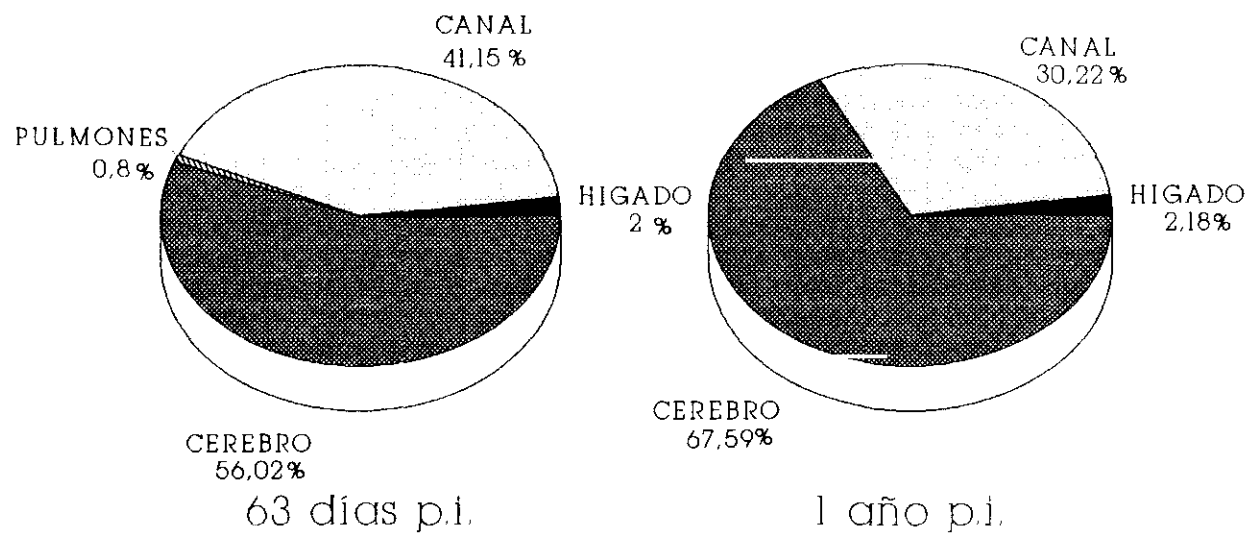
O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

FIGURA 13
% Larvas por órgano



Cepa BALB/c

TRATAMIENTO ESTADISTICO

Cepa BALB/c

	<u>Día 63 p.i.</u>			<u>1 año p.i.</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- HIGADO (% L)	6	2,001	1,129	5	2,188	3,490	2,262	0,124	0,05	NO
- PULMONES (% L)	6	0,802	0,678	5	0	0	2,262	2,621	0,05	SI
- CANAL (% L)	6	41,155	13,570	5	30,228	6,389	2,262	1,644	0,05	NO
- CEREBRO (% L)	6	56,025	12,512	5	67,598	7,669	2,262	1,797	0,05	NO
- TOTAL (L)	6	78,666	35,252	5	29	3,606	2,262	3,109	0,05	SI

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

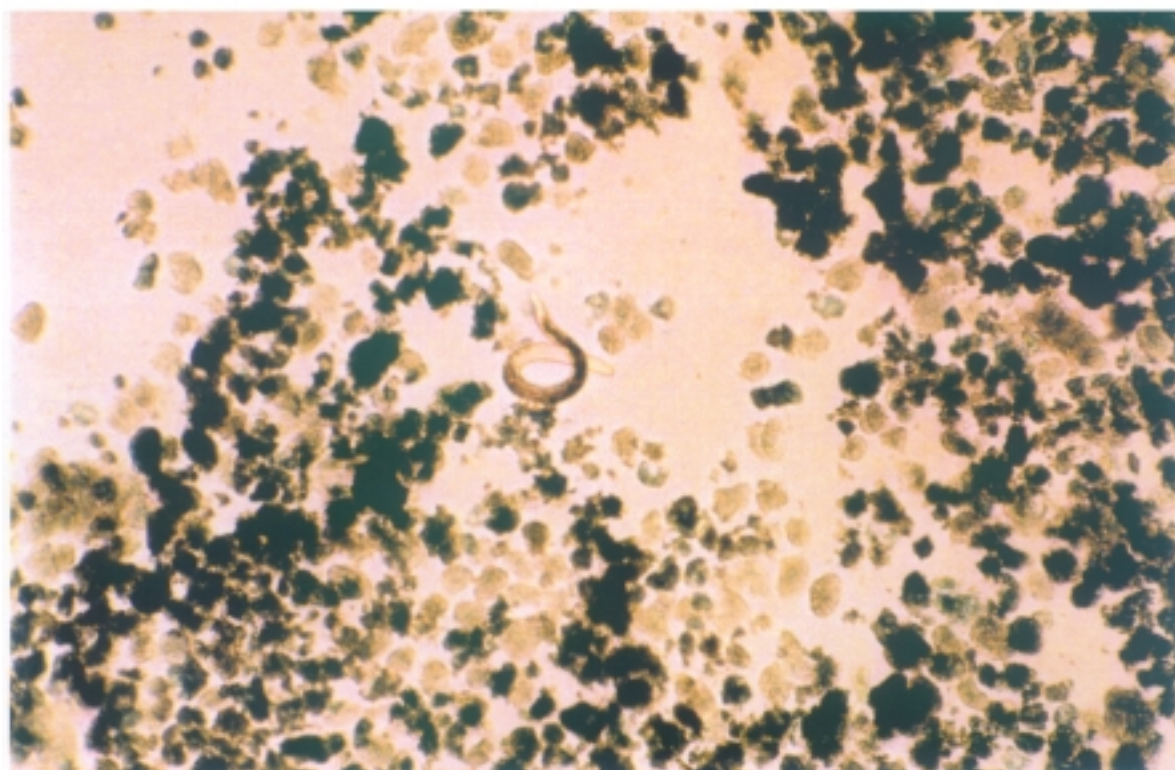


FOTO 1 (10 X)



FOTO 2 (20 X)

Larvas de I. canis obtenidas mediante digestión del hígado de un ratón de la cepa BALB/c, inoculado V.O. con huevos embrionados del parásito. (1 año p.i.)

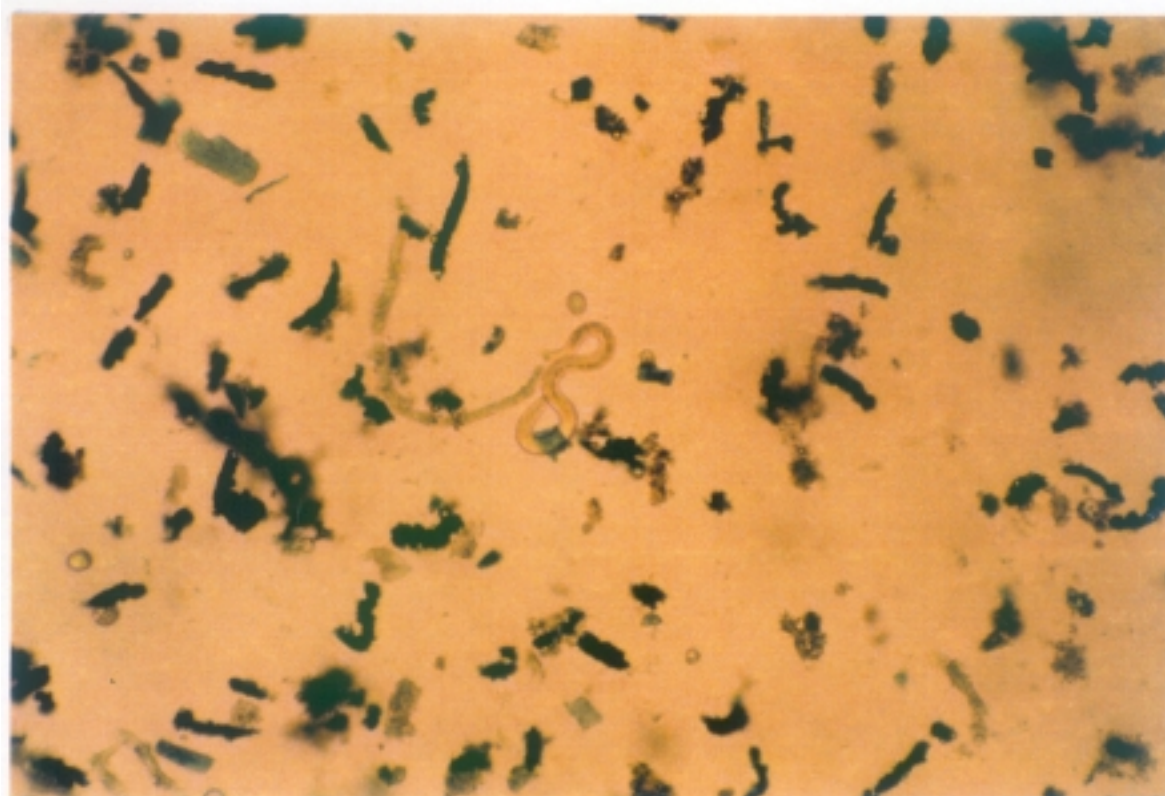


FOTO 3 (10 X)



FOTO 4 (20 X)

Larvas de T. canis obtenidas mediante digestión de la canal de un ratón de la cepa BALB/c, inoculado V.O. con huevos embrionados del parásito. (1 año p.i.)



FOTO 5 (20 X)



FOTO 6 (20 X)

Larvas de T. canis en el cerebro de un ratón de la cepa BALB/c inoculado V.O. con huevos embrionados del parásito (1 año p.i.)

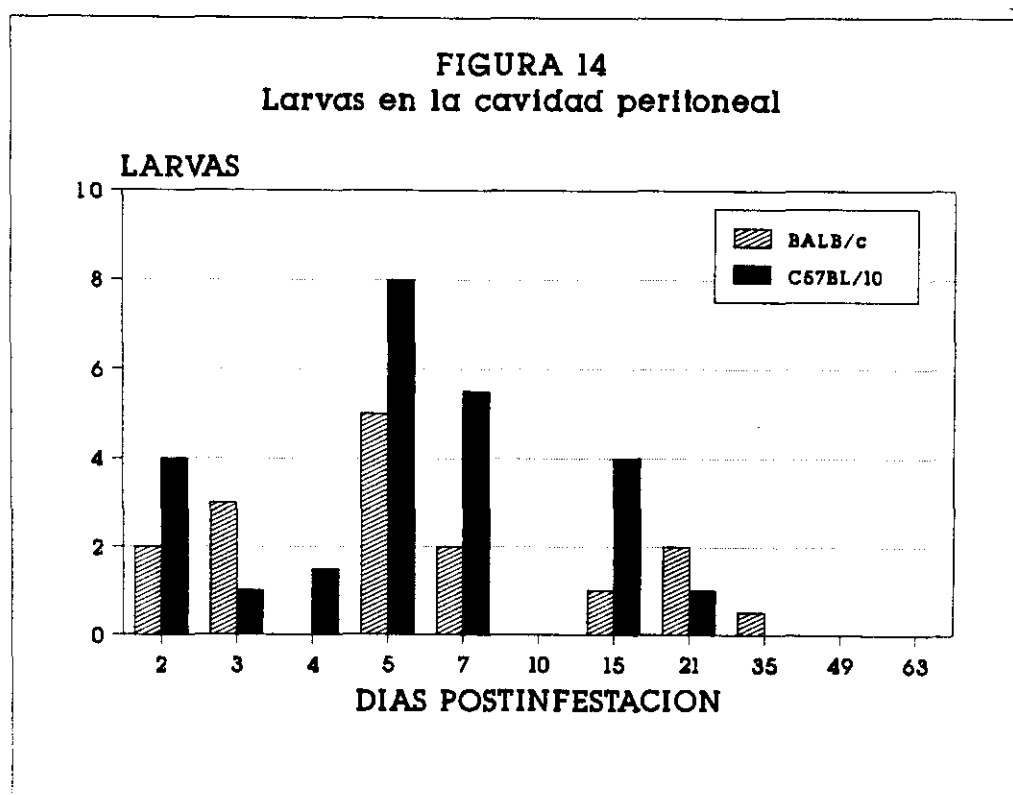
4.1.3.- INVESTIGACION DE LARVAS EN LA CAVIDAD PERITONEAL

TABLA LI
LARVAS EN LA CAVIDAD PERITONEAL

$\bar{X} L \backslash D$	2	3	4	5	7	10	15	21	35	49	63
BALB/c	2	3	0	5	2	0	1	2	0,5	0	0
C57BL/10	4	1	1,5	8	5,5	0	4	1	0	0	0

D = Días postinoculación

$\bar{X} L$ = Media del número de larvas recuperadas



4.1.4.- RESPUESTA INMUNITARIA EOSINOFILICA

4.1.4.1.- EN RATONES BALB/c

TABLA LII
BALB/c % DE EOSINOFILOS

$\begin{matrix} D \\ F \end{matrix}$	0	2	3	4	5	7	10	15	21	35	49	63
1	2	3	1	4	7	15	10	12	10	15	10	10
2	1	1	5	4	5	8	17	14	14	12	12	10
3	5	1	3	3	5	10	21	8	10	11	11	13
4	5	5	1	5	10	13	15	12	10	5	9	17
5	1	5	5	3	7	14	17	10	12	5	14	6
6	4	6	4	4	7	12	15	8	6	17	17	10
\bar{X}	3	3,5	3,16	3,83	6,83	12,00	15,83	10,66	10,33	10,83	12,16	11

4.1.4.2.- EN RATONES C57BL/10

TABLA LIII
C57BL/10 % DE EOSINOFILOS

$\begin{matrix} D \\ F \end{matrix}$	0	2	3	4	5	7	10	15	21	35	49	63
1	4	1	3	4	6	8	15	15	7	5	5	3
2	7	2	2	4	4	4	8	15	13	3	3	4
3	3	2	3	4	9	8	10	16	15	4	3	5
4	3	2	3	4	5	9	10	22	7	3	7	5
5	4	3	1	4	3	7	12	18	9	4	7	6
6	2	2	2	2	5	6	10	26	8	4	3	8
\bar{X}	3,83	2	2,33	3,66	5,33	7,00	10,83	18,66	9,83	3,83	4,66	5,16

% DE EOSINOFILOS = Porcentaje de eosinófilos

D = Días postinoculación

F = Frotis sanguíneo analizado

\bar{X} = Media del porcentaje de eosinófilos

4.1.4.3.- TRATAMIENTO ESTADISTICO

<u>Días p.i.</u>	<u>BALB/c</u>			<u>C57BL/10</u>			<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>				
0	6	3	1,897	6	3,833	1,722	2,228	0,797	0,01	NO
2	6	3,5	2,168	6	2	0,632	2,228	1,627	0,01	NO
3	6	3,167	1,835	6	2,333	0,816	2,228	1,016	0,01	NO
4	6	3,833	0,753	6	3,667	0,816	2,228	0,368	0,01	NO
5	6	6,833	1,835	6	5,333	2,066	2,228	1,330	0,01	NO
7	6	12	2,608	6	7	1,789	3,581	3,873	0,005	SI
10	6	15,833	3,601	6	10,833	2,401	2,228	2,830	0,01	SI
15	6	10,667	2,422	6	18,667	4,457	3,581	3,863	0,005	SI
21	6	10,333	2,658	6	9,833	3,371	2,228	0,285	0,01	NO
35	6	10,833	4,997	6	3,833	0,753	3,169	3,393	0,01	SI
49	6	12,167	2,927	6	4,667	1,966	4,587	5,210	0,001	SI
63	6	11	3,688	6	5,167	1,722	3,169	3,511	0,01	SI

Días p.i. Días postinoculación

n Número de muestras analizadas

\bar{x} Media aritmética del %
de eosinófilos

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

4.1.4.4.- REPRESENTACION CONJUNTA

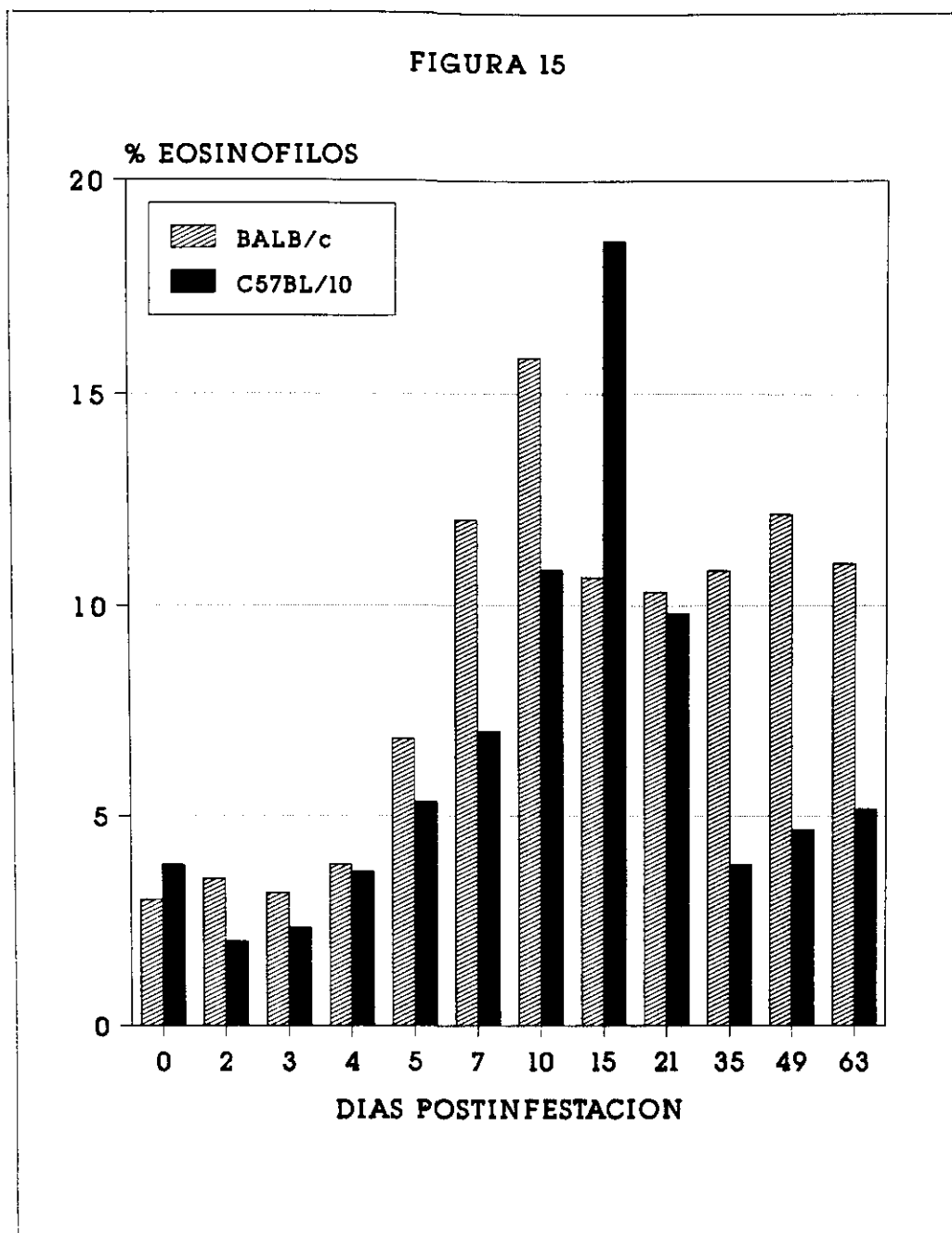


TABLA LIV
BALB/c DINAMICA DE ANTICUERPOS

D. p.i.	0	2	3	4	5	7	10	15	21	35	49	63
D.O.	0,272	0,302	0,285	0,258	0,309	0,323	0,384	0,568	0,791	1,069	1,139	1,164
Ag E/S	0,228	0,271	0,295	0,281	0,295	0,324	0,400	0,550	0,704	0,932	1,060	1,090
D.O.	0,117	0,118	0,119	0,134	0,131	0,129	0,148	0,132	0,148	0,143	0,158	0,144
B.S.A.	0,144	0,139	0,122	0,136	0,163	0,153	0,187	0,157	0,179	0,178	0,160	0,171
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,120	0,158	0,170	0,134	0,155	0,182	0,225	0,415	0,584	0,840	0,940	0,970
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	1,31	1,41	1,11	1,29	1,51	1,87	3,45	4,86	7	7,83	8,08

D. p.i. = Días postinoculación

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$ = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/2.000

TABLA LV
C57BL/10 DINAMICA DE ANTICUERPOS

D. p.i.	0	2	3	4	5	7	10	15	21	35	49	63
D.O.	0,281	0,358	0,369	0,315	0,382	0,490	0,550	0,717	0,878	0,996	1,077	1,090
Ag E/S	0,228	0,304	0,314	0,270	0,338	0,437	0,462	0,535	0,671	0,792	0,912	0,857
D.O.	0,123	0,140	0,150	0,138	0,163	0,190	0,169	0,198	0,172	0,177	0,193	0,175
B.S.A.	0,096	0,118	0,125	0,111	0,122	0,156	0,133	0,163	0,142	0,137	0,149	0,125
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,145	0,202	0,204	0,168	0,218	0,290	0,355	0,446	0,617	0,737	0,823	0,823
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	—	1,39	1,40	1,15	1,50	2	2,44	3,07	4,25	5,08	5,67	5,67

D. p.i. = Días postinoculación

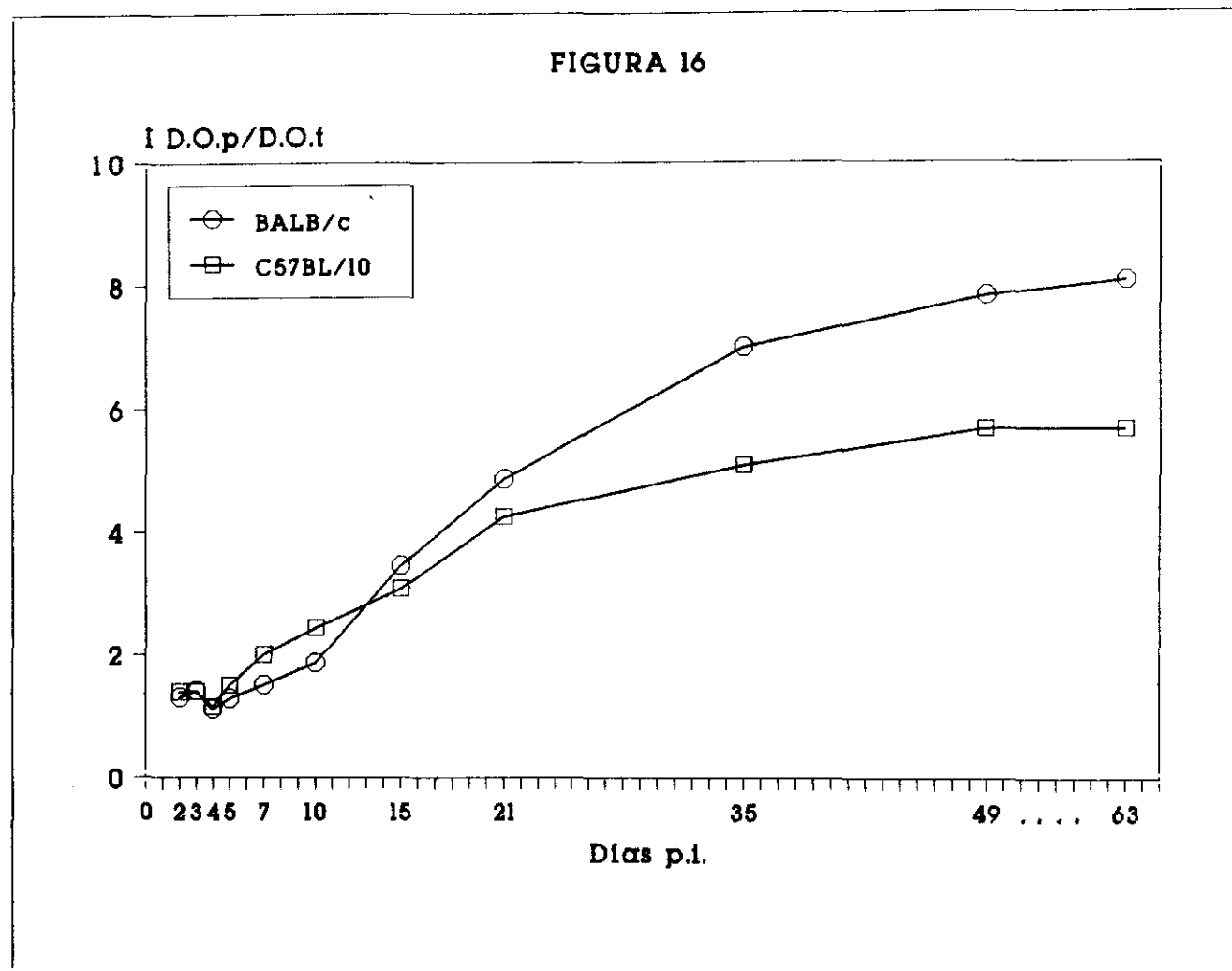
D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$ = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/2.000



$I\ D.O.p/D.O.t$ = Densidad óptica problema/Densidad óptica testigo

Días p.i. = Días postinoculación

4.2.- TRATAMIENTO CON MEBENDAZOL

4.2.1.- EVALUACION MEDIANTE RECUPERACION LARVARIA

4.2.1.1.- EFICACIA DEL TRATAMIENTO EN FASE HEPATO-PULMONAR

4.2.1.1.1.- Lote Ia: Control

TABLA LVI
Lote Ia: Control

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	14	13,20	3	2,83	58	54,71	31	28,24	106
R ₂	17	13,60	5	4,00	72	57,60	31	24,80	125
R ₃	11	11,00	7	7,00	50	50,00	32	32,00	100
R ₄	12	13,63	3	3,40	52	58,09	21	23,86	88
R ₅	14	12,17	4	3,47	72	62,60	25	21,73	115
R ₆	7	8,86	4	5,06	42	53,16	26	32,91	79
\bar{x}	12,5	12,07	4,33	4,29	57,66	56,19	27,66	27,42	102,16

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

4.2.1.1.2.- Lote IIa: Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa

TABLA LVII
Lote IIa: MBZc c.m.c. (100 mg/kg/día)

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	45	54,21	17	20,48	17	20,48	4	4,81	83
R ₂	45	67,16	8	11,94	11	16,41	3	4,47	67
R ₃	45	69,23	12	18,46	5	7,69	3	4,61	65
R ₄	49	70,00	15	21,42	5	7,14	1	1,42	70
R ₅	38	44,18	7	8,13	31	36,04	10	11,62	86
R ₆	33	67,34	5	10,20	8	16,32	3	6,12	49
\bar{x}	42,5	62,02	10,66	15,10	12,83	17,34	4	5,50	70

MBZc c.m.c. = Mebendazol comercial en carboximetilcelulosa

O = Organo

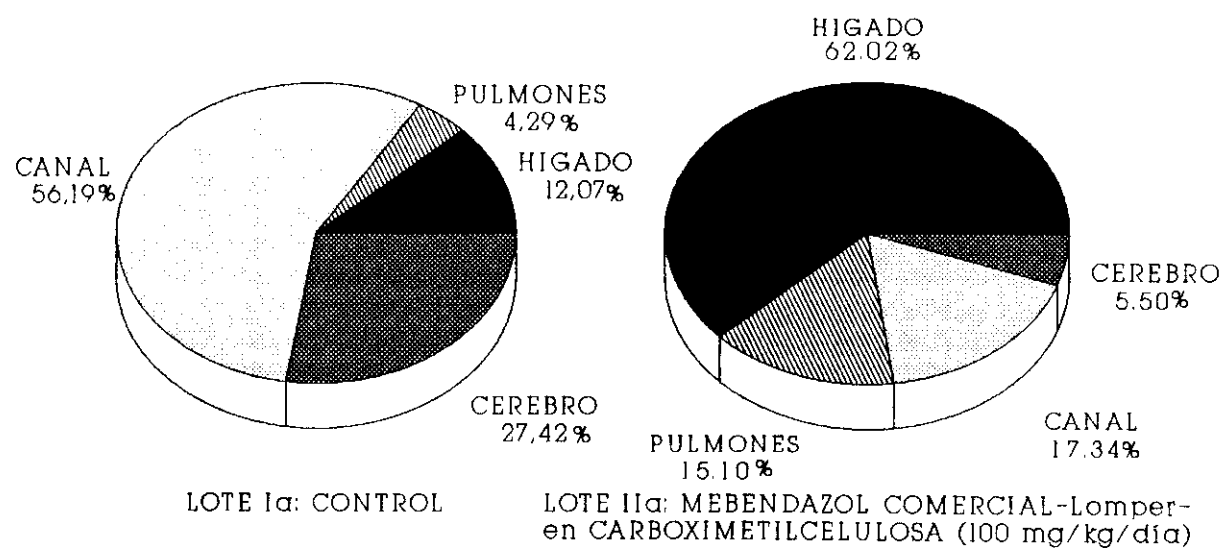
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

FIGURA 17
% Larvas por órgano



Tratamiento en fase hepato-pulmonar

4.2.1.1.3.- Lote IIIa: Mebendazol en carboximetilcelulosa

TABLA LVIII
Lote IIIa: MBZ c.m.c. (100 mg/kg/día)

D R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	10	40,00	9	36,00	6	24,00	0	0	25
R ₂	25	35,71	6	8,57	36	51,42	3	4,28	70
R ₃	22	40,74	9	16,66	20	37,03	3	5,55	54
R ₄	19	32,75	5	8,62	34	58,62	0	0	58
R ₅	14	14,73	10	10,52	70	73,68	1	1,05	95
R ₆	15	30,00	13	26,00	14	28,00	8	16,00	50
\bar{x}	17,50	32,32	8,66	17,72	30	45,45	2,5	4,48	58,66

MBZ c.m.c. = Mebendazol en carboximetilcelulosa

O = Organo

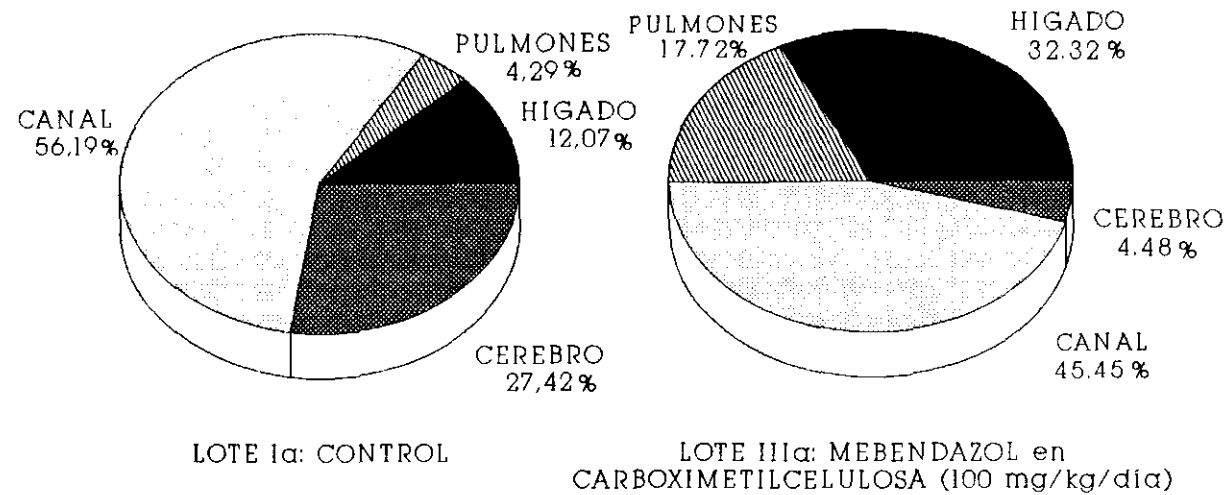
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

FIGURA 18
% Larvas por órgano



Tratamiento en fase hepato-pulmonar

4.2.1.1.4.- Lote IVa: Mebendazol en agua

TABLA LIX
Lote IVa: MBZ a. (100 mg/kg/día)

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	27	29,67	13	14,28	40	43,95	11	12,08	91
R ₂	49	33,33	19	12,92	62	42,17	17	11,56	147
R ₃	9	7,43	11	9,09	82	67,76	19	15,70	121
R ₄	13	20,00	6	9,23	38	58,46	8	12,30	65
R ₅ '	27	19,42	7	5,03	90	64,74	15	10,79	139
R ₆	40	28,16	12	8,45	70	49,29	20	14,08	142
\bar{x}	27,50	23,00	11,33	9,83	63,66	54,39	15	12,75	117,5

MBZ a. = Mebendazol en agua

O = Organo

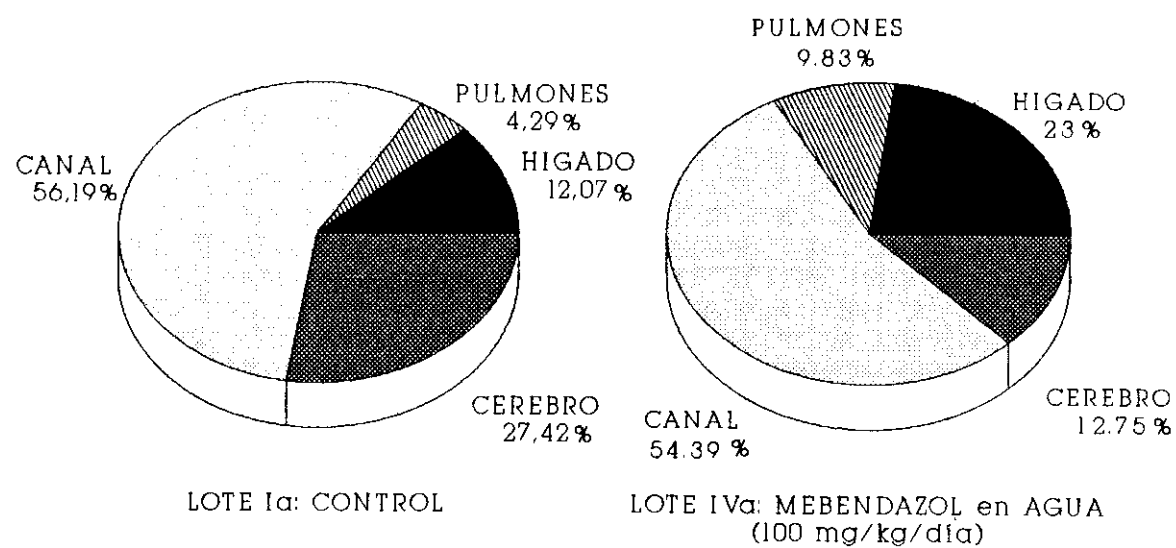
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

FIGURA 19
% Larvas por órgano



Tratamiento en fase hepato-pulmonar

4.2.1.1.5.- Lotes Va, VIa y VIIa: Mebendazol en dispersión sólida

TABLA LX
Lote Va: MBZ d.s. (100 mg/kg/día)

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	69	49,64	28	20,14	24	17,26	18	12,94	139
R ₂	49	34,02	15	10,41	54	37,50	26	18,05	144
R ₃	97	65,98	30	20,40	14	9,52	6	4,08	147
R ₄	18	18,18	8	8,08	50	50,50	23	23,23	99
R ₅	16	14,15	6	5,30	78	69,02	13	11,50	113
R ₆	28	23,93	13	11,11	56	47,86	20	17,09	117
\bar{x}	46,16	34,31	16,66	12,57	46	38,61	17,66	14,48	126,5

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

O = Organo

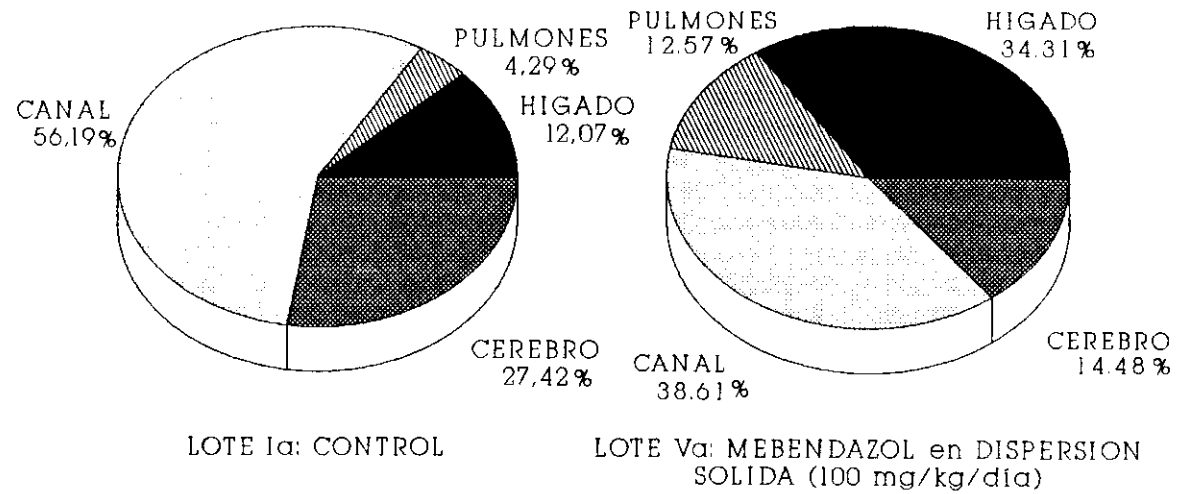
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

FIGURA 20
% Larvas por órgano



Tratamiento en fase hepato-pulmonar

TABLA LXI
Lote VIa: MBZ d.s. (50 mg/kg/día)

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	28	37,33	20	26,66	18	24,00	9	12,00	75
R ₂	18	19,78	6	6,59	44	48,35	23	25,27	91
R ₃	26	27,36	7	7,36	42	44,21	20	21,05	95
R ₄	9	16,66	7	12,96	28	51,85	10	18,51	54
R ₅	46	52,87	13	14,94	20	22,98	8	9,19	87
R ₆	10	18,18	7	12,72	30	54,54	8	14,54	55
\bar{x}	22,83	28,69	10	13,53	30,33	40,98	13	16,76	76,16

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

O = Organo

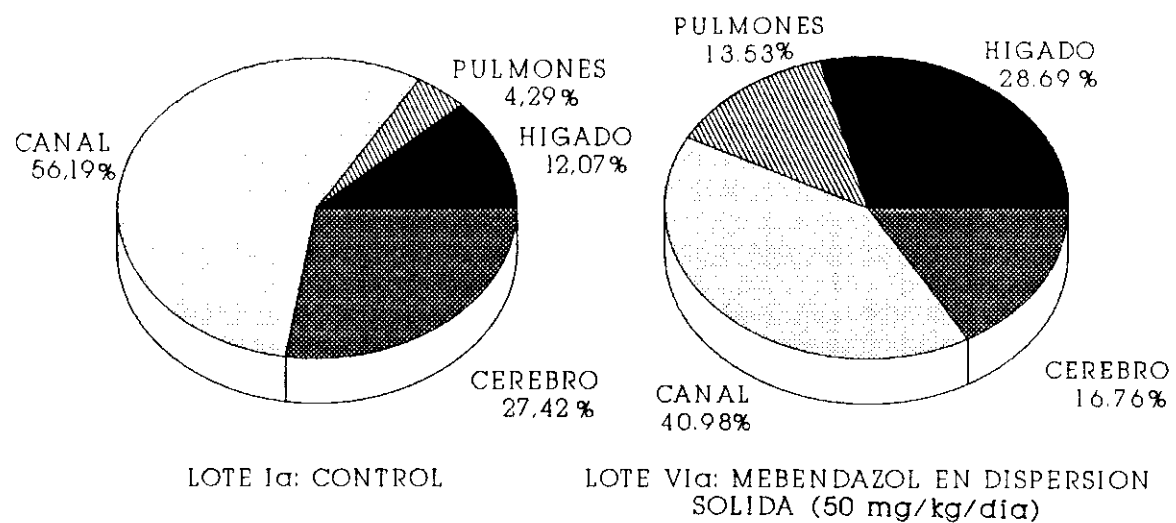
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

FIGURA 21
% Larvas por órgano



Tratamiento en fase hepato-pulmonar

TABLA LXII
Lote VIIa: MBZ d.s. (25 mg/kg/día)

R \ O	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	15	25,86	3	5,17	28	48,27	12	20,68	58
R ₂	13	21,31	3	4,91	28	45,90	17	27,86	61
R ₃	0	0	1	1,35	48	64,86	25	33,78	74
R ₄	5	13,88	2	5,55	10	27,77	19	52,77	36
R ₅	18	22,22	1	1,23	36	44,44	26	32,09	81
\bar{X}	10,2	16,65	2	3,64	30	46,24	19,8	33,43	62

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

O = Organo

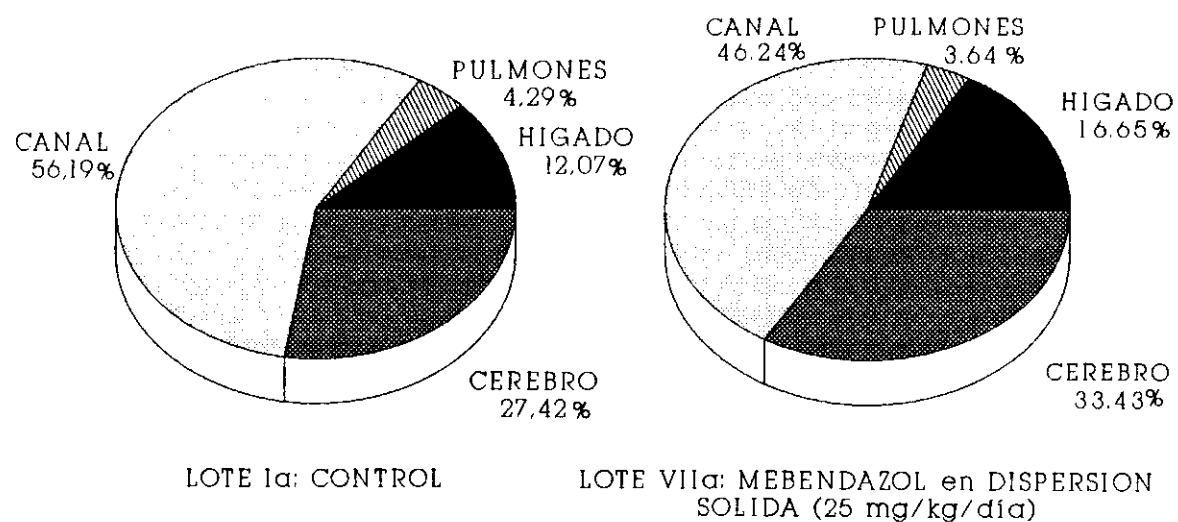
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{X} = Media aritmética

FIGURA 22
% Larvas por órgano



Tratamiento en fase hepato-pulmonar

4.2.1.1.6.- Tratamiento estadístico

Lote Ia: Control

Lote IIa: MBZc c.m.c.

(100 mg/kg/día)

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	12,077	1,871	6	62,02	10,485	4,587	11,487	0,001	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	4,293	1,524	6	15,105	5,705	3,581	4,485	0,005	SI
- <u>CANAL (% L)</u>	6	56,193	4,498	6	17,347	10,570	4,587	8,283	0,001	SI
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	27,423	4,612	6	5,508	3,371	4,587	9,397	0,001	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	6	102,167	16,987	6	70	13,416	3,581	3,640	0,005	SI

MBZc c.m.c. Mebendazol comercial en carboximetilcelulosa

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Lote Ia: Control

Lote IIIa: MBZ c.m.c.

(100 mg/kg/día)

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	12,077	1,871	6	32,322	9,554	4,587	5,094	0,001	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	4,293	1,524	6	17,728	11,155	2,228	2,923	0,05	SI
<u>- CANAL (% L)</u>	6	56,193	4,498	6	45,458	19,191	2,228	1,334	0,05	NO
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	27,423	4,612	6	4,48	6,096	4,587	7,352	0,001	SI
<u>- TOTAL (L)</u>	6	102,167	16,987	6	58,667	23,149	3,581	3,711	0,005	SI

MBZ c.m.c. Mebendazol en carboximetilcelulosa

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Lote Ia: Control

Lote IVa: MBZ a.
(100 mg/kg/día)

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	12,077	1,871	6	23,002	9,403	2,228	2,971	0,05	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	4,293	1,524	6	9,833	3,323	3,581	3,712	0,005	SI
- <u>CANAL (% L)</u>	6	56,193	4,498	6	54,395	10,833	2,228	0,376	0,05	NO
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	27,423	4,612	6	12,752	7,254	4,587	7,254	0,001	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	6	102,167	16,987	6	117,50	32,874	2,228	1,015	0,05	NO

MBZ a. Mebendazol en agua
% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado
L Número total de larvas recuperadas
n Número de ratones
 \bar{x} Media aritmética de %L ó de L
D.S. Desviación standard
"t" teór. "t" de Student teórica
"t" real "t" de Student real
P Probabilidad
Sig. Significativo

Lote Ia: Control

Lote Va: MBZ d.s.

(100 mg/kg/día)

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	12,077	1,871	6	34,317	20,062	2,228	2,704	0,05	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	4,293	1,524	6	12,573	6,300	2,228	3,129	0,05	SI
<u>- CANAL (% L)</u>	6	56,193	4,498	6	38,61	22,159	2,228	1,905	0,05	NO
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	27,423	4,612	6	14,482	6,566	3,581	3,951	0,005	SI
<u>- TOTAL (L)</u>	6	102,167	16,987	6	126,5	19,553	2,228	2,301	0,05	SI

MBZ d.s. Mebendazol en dispersión sólida

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Lote Ia: Control

Lote VIa: MBZ d.s.

(50 mg/kg/día)

	n	\bar{x}	D.S.	n	\bar{x}	D.S.	"t" teór.	"t" real	P <	Sig.
- HIGADO (% L)	6	12,077	1,871	6	28,697	14,111	2,228	2,860	0,05	SI
- PULMONES (% L)	6	4,293	1,524	6	13,538	7,233	2,228	3,063	0,05	SI
- CANAL (% L)	6	56,193	4,498	6	40,988	13,994	2,228	2,534	0,05	SI
- CEREBRO (% L)	6	27,423	4,612	6	16,76	5,980	3,169	3,459	0,01	SI
- TOTAL (L)	6	102,167	16,987	6	76,167	18,071	2,228	2,568	0,05	SI

MBZ d.s. Mebendazol en dispersión sólida

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Lote Ia: Control

Lote VIIa: MBZ d.s.

(25 mg/kg/día)

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- HIGADO (% L)	6	12,077	1,871	5	16,654	10,277	2,262	1,081	0,05	NO
- PULMONES (% L)	6	4,293	1,524	5	3,642	2,160	2,262	0,587	0,05	NO
- CANAL (% L)	6	56,193	4,498	5	46,248	13,185	2,262	1,746	0,05	NO
- CEREBRO (% L)	6	27,423	4,612	5	33,436	11,933	2,262	1,146	0,05	NO
- TOTAL (L)	6	102,167	16,987	5	62	17,306	3,690	3,872	0,005	SI

MBZ d.s. Mebendazol en dispersión sólida

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

TABLA LXIII
CUADRO RESUMEN

\bar{x} L \bar{x} % L	Lote Ia	Lote IIa	Lote IIIa	Lote IVa	Lote Va	Lote VIa	Lote VIIa
HIGADO	12,50 12,07	42,50 62,02	17,50 32,32	27,50 23,00	46,16 34,31	22,83 28,69	10,20 16,65
PULMONES	4,33 4,29	10,66 15,10	8,66 17,72	11,33 9,83	16,66 12,57	10,00 13,53	2,00 3,64
CANAL	57,66 56,19	12,83 17,34	30,00 45,45	63,66 54,39	46,00 38,61	30,33 40,98	30,00 46,24
CEREBRO	27,66 27,42	4,00 5,50	2,50 4,48	15,00 12,75	17,66 14,48	13,00 16,76	19,80 33,43
TOTAL	102,16	69,99	58,66	117,50	126,50	76,16	62,00

\bar{x} L = Media del número de larvas recuperadas por digestión

\bar{x} % L = Media del porcentaje de larvas respecto al total recuperado

Lote Ia = Control

Lote IIa = Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IIIa = Mebendazol en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

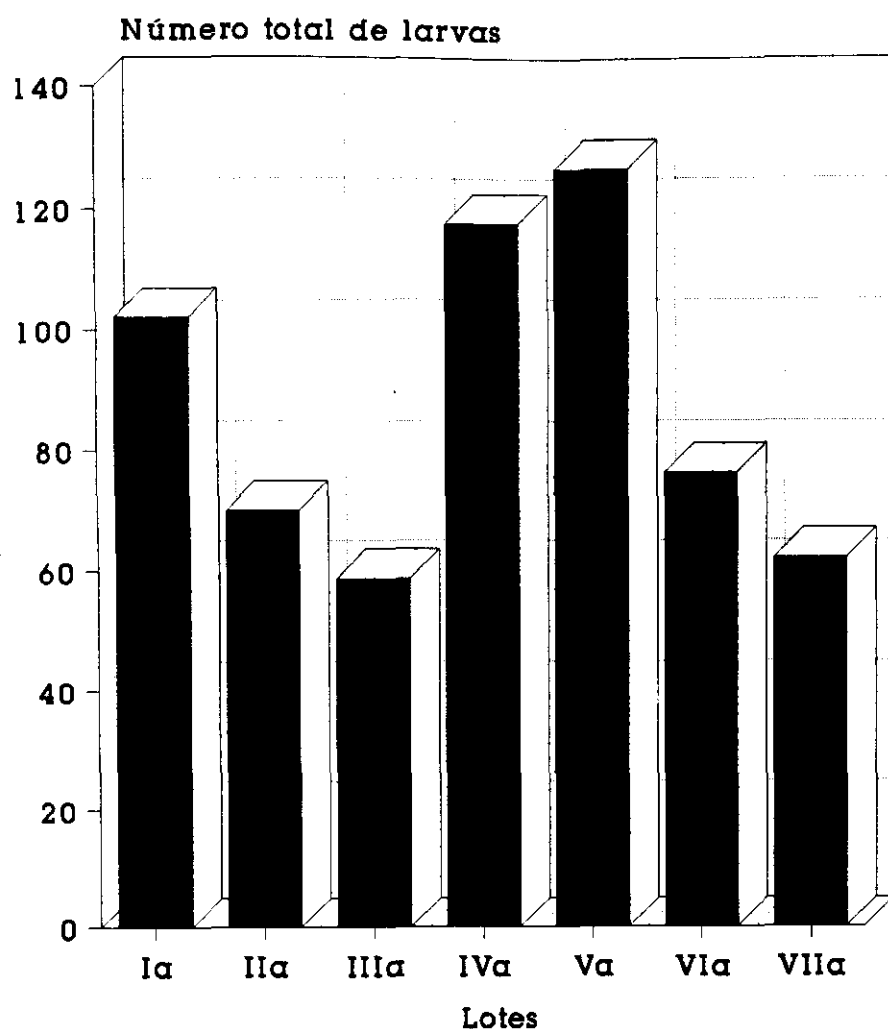
Lote IVa = Mebendazol en agua (100 mg/kg/día)

Lote Va = Mebendazol en dispersión sólida (100 mg/kg/día)

Lote VIa = Mebendazol en dispersión sólida (50 mg/kg/día)

Lote VIIa = Mebendazol en dispersión sólida (25 mg/kg/día)

FIGURA 23
CARGA PARASITARIA TOTAL



Tratamiento en fase hepato-pulmonar

Lote Ia = Control

Lote IIa = Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IIIa = Mebendazol en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IVa = Mebendazol en agua (100 mg/kg/día)

Lote Va = Mebendazol en dispersión sólida (100 mg/kg/día)

Lote VIa = Mebendazol en dispersión sólida (50 mg/kg/día)

Lote VIIa: Mebendazol en dispersión sólida (25 mg/kg/día)

4.2.1.2.- EFICACIA DEL TRATAMIENTO EN FASE MIOTROPICA-NEUROTROPICA

4.2.1.2.1. - Lote Ib: Control

TABLA LXIV
Lote Ib: Control

D R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	4	3,77	0	0	62	58,49	40	37,73	106
R ₂	2	2,98	0	0	30	44,77	35	52,23	67
R ₃	0	0	0	0	38	44,18	48	55,81	86
R ₄	1	1,33	0	0	20	26,66	54	72,00	75
R ₅	3	4,61	0	0	20	30,76	42	64,61	65
R ₆	1	0,80	0	0	76	61,29	47	37,90	124
\bar{x}	1,83	2,24	0	0	41	44,35	44,33	53,38	87,16

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

4.2.1.2.2.- Lote IIb: Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa

TABLA LXV
Lote IIb: MBZc c.m.c. (100 mg/kg/día)

D R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	3	10,00	0	0	12	40,00	15	50,00	30
R ₂	7	18,42	0	0	18	47,36	13	34,21	38
R ₃	2	6,66	0	0	24	80,00	4	13,33	30
R ₄	2	14,28	0	0	5	35,71	7	50,00	14
R ₅	2	3,38	3	5,08	36	61,01	18	30,50	59
R ₆	0	0	0	0	12	57,14	9	42,85	21
\bar{x}	2,66	8,79	0,5	0,84	17,83	53,53	11	36,81	32

MBZc c.m.c. = Mebendazol comercial en carboximetilcelulosa

O = Organo

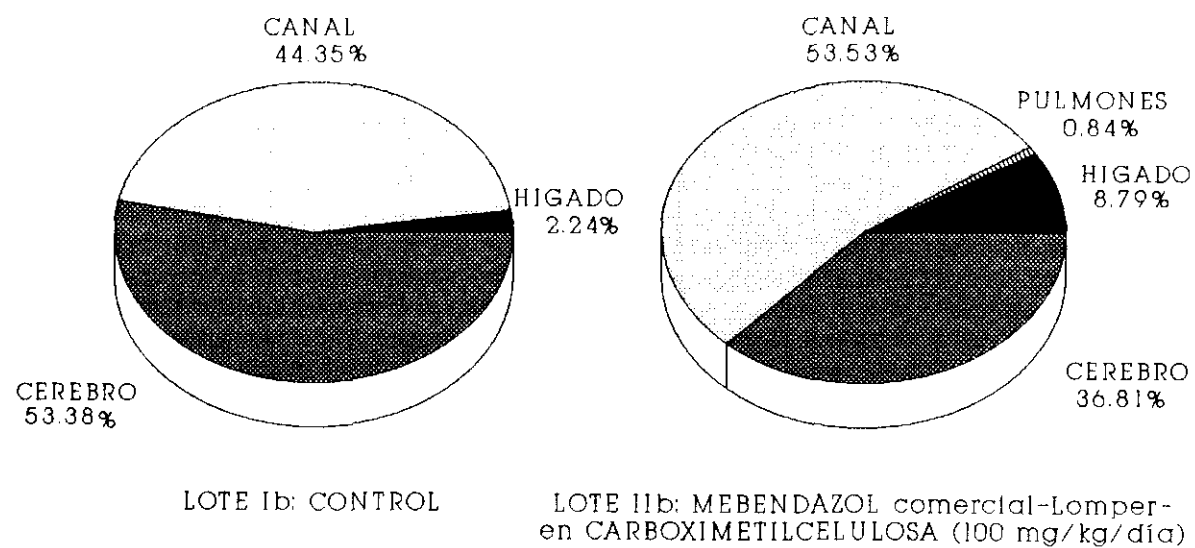
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

FIGURA 24
% Larvas por órgano



Tratamiento en fase miotrópica-neurotrópica

4.2.1.2.3.- Lote IIIb: Mebendazol en carboximetilcelulosa

TABLA LXVI

Lote IIIb: MBZ c.m.c. (100 mg/kg/día)

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	0	0	0	0	10	31,25	22	68,75	32
R ₂	1	2,43	1	2,43	22	53,65	17	41,46	41
R ₃	0	0	1	2,77	18	50,00	17	47,22	36
R ₄	0	0	1	2,50	18	45,00	21	52,50	40
R ₅	2	5,40	1	2,70	14	37,83	20	54,05	37
R ₆	2	5,00	0	0	18	45,00	20	50,00	40
\bar{x}	0,83	2,13	0,66	1,73	16,66	43,78	19,50	52,33	37,66

MBZ c.m.c. = Mebendazol en carboximetilcelulosa

O = Organo

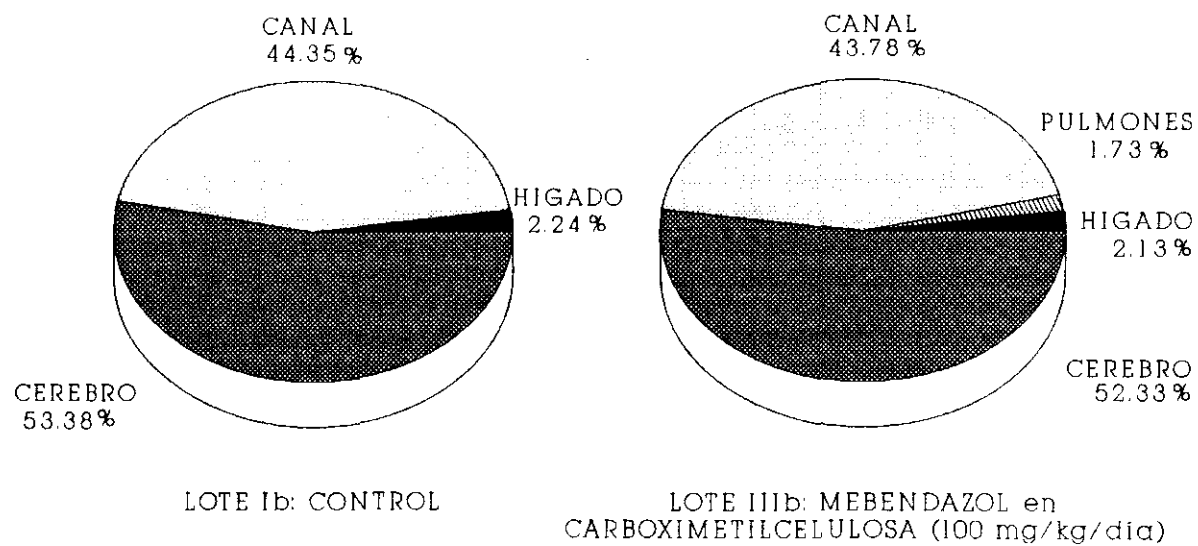
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

FIGURA 25
% Larvas por órgano



Tratamiento en fase miotrópica-neurotrópica

4.2.1.2.4.- Lote IVb: Mebendazol en agua

TABLA LXVII
Lote IVb: MBZ a. (100 mg/kg/día)

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	1	1,17	0	0	42	49,41	42	49,41	85
R ₂	3	3,48	1	1,16	48	55,81	34	39,53	86
R ₃	0	0	0	0	38	55,07	31	44,92	69
R ₄	1	1,61	0	0	28	45,16	33	53,22	62
R ₅	0	0	0	0	30	55,55	24	44,44	54
R ₆	1	2,17	0	0	26	56,52	19	41,30	46
\bar{x}	1	1,40	0,16	0,19	35,33	52,92	30,50	45,47	67

MBZ a. = Mebendazol en agua

O = Organo

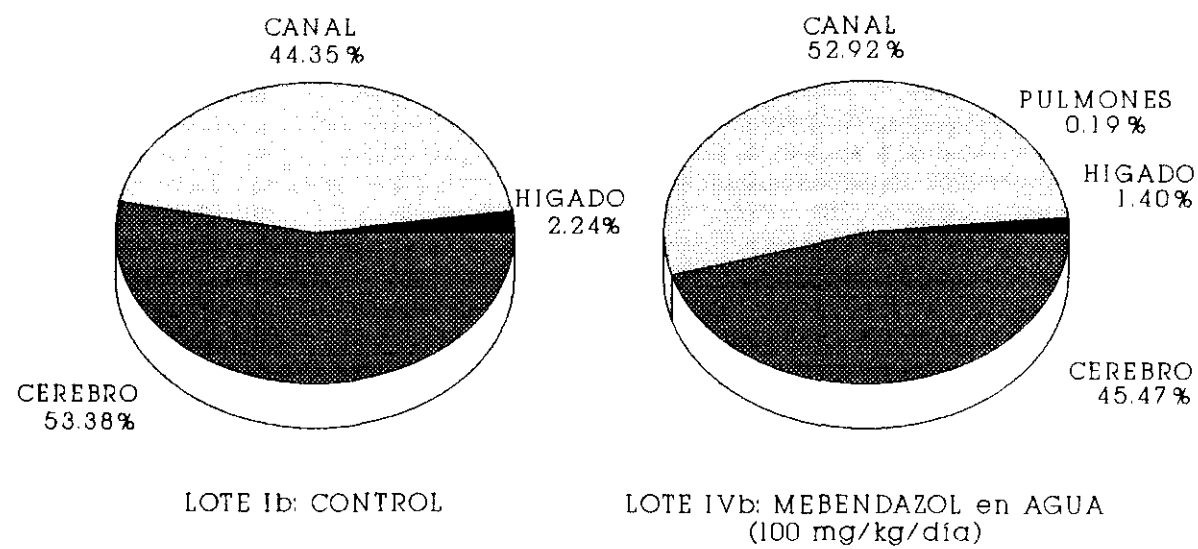
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = media aritmética

FIGURA 26
% Larvas por órgano



Tratamiento en fase miotrópica-neurotrópica

4.2.1.2.5.- Lotes Vb, VIb y VIIb: Mebendazol en dispersión sólida

TABLA LXVIII
Lote Vb: MBZ d.s. (100 mg/kg/día)

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	3	6,38	0	0	18	38,29	26	55,31	47
R ₂	0	0	0	0	24	61,53	15	38,46	39
R ₃	1	4,76	0	0	4	19,04	16	76,19	21
R ₄	0	0	0	0	6	22,22	21	77,77	27
R ₅	0	0	0	0	12	38,70	19	61,29	31
R ₆	5	38,46	0	0	4	30,76	4	30,76	13
\bar{x}	1,5	8,26	0	0	11,33	35,09	16,83	56,63	29,66

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

O = Organo

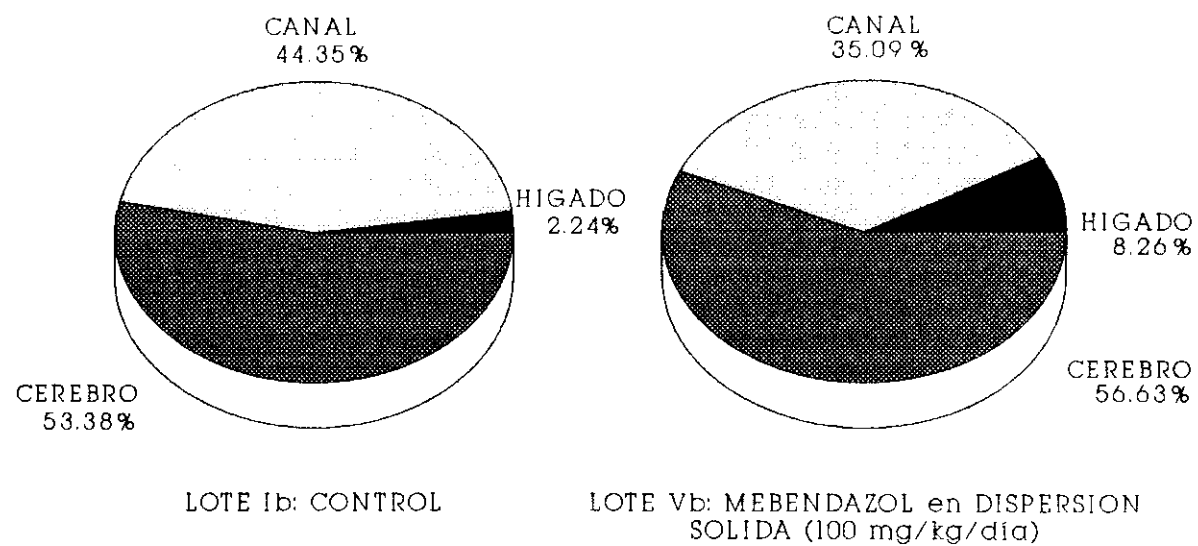
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

FIGURA 27
% Larvas por órgano



Tratamiento en fase miotrópica-neurotrópica

TABLA LXIX
Lote Vib: MBZ d.s. (50 mg/kg/día)

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	3	6,38	0	0	18	38,29	26	55,31	47
R ₂	0	0	0	0	24	61,53	15	38,46	39
R ₃	1	4,76	0	0	4	19,04	16	76,19	21
R ₄	0	0	0	0	6	22,22	21	77,77	27
R ₅	0	0	0	0	12	38,70	19	61,29	31
X	0,8	2,22	0	0	12,8	35,95	19,4	61,80	33

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

O = Órgano

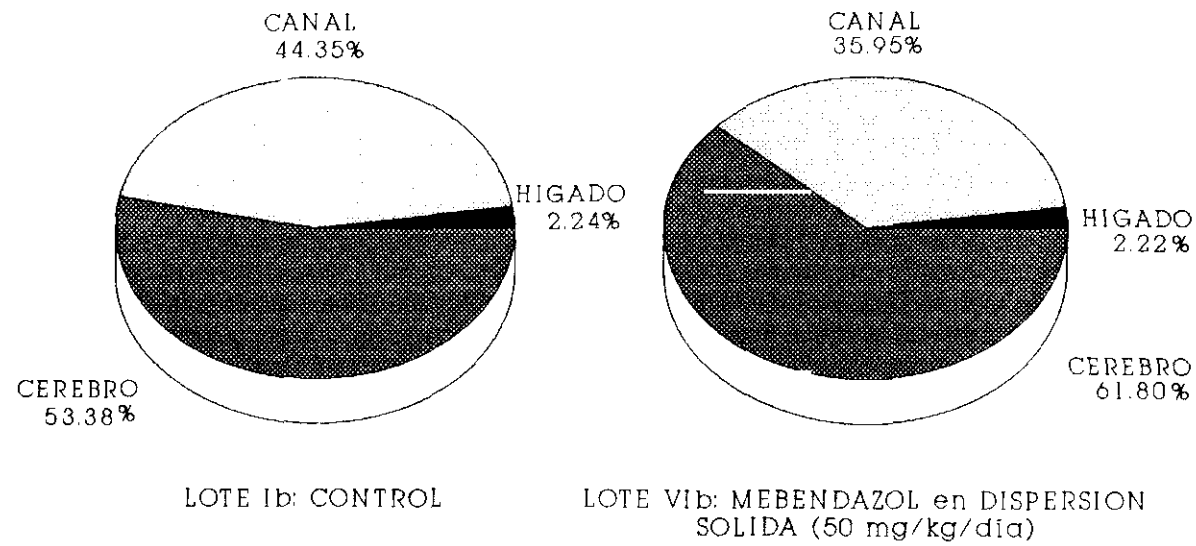
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

FIGURA 28
% Larvas por órgano



Tratamiento en fase miotrópica-neurotrópica

TABLA LXX
Lote VIIb: MBZ d.s. (25 mg/kg/día)

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	0	0	0	0	10	29,41	24	70,58	34
R ₂	1	3,33	0	0	4	13,33	25	83,33	30
R ₃	2	6,66	0	0	8	26,66	20	66,66	30
R ₄	2	3,84	0	0	14	26,92	36	69,23	52
R ₅	0	0	0	0	16	34,78	30	65,21	46
R ₆	0	0	1	3,12	4	12,50	27	84,37	32
\bar{x}	0,83	2,30	0,16	0,52	9,33	23,93	27	73,23	37,33

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

O = Organo

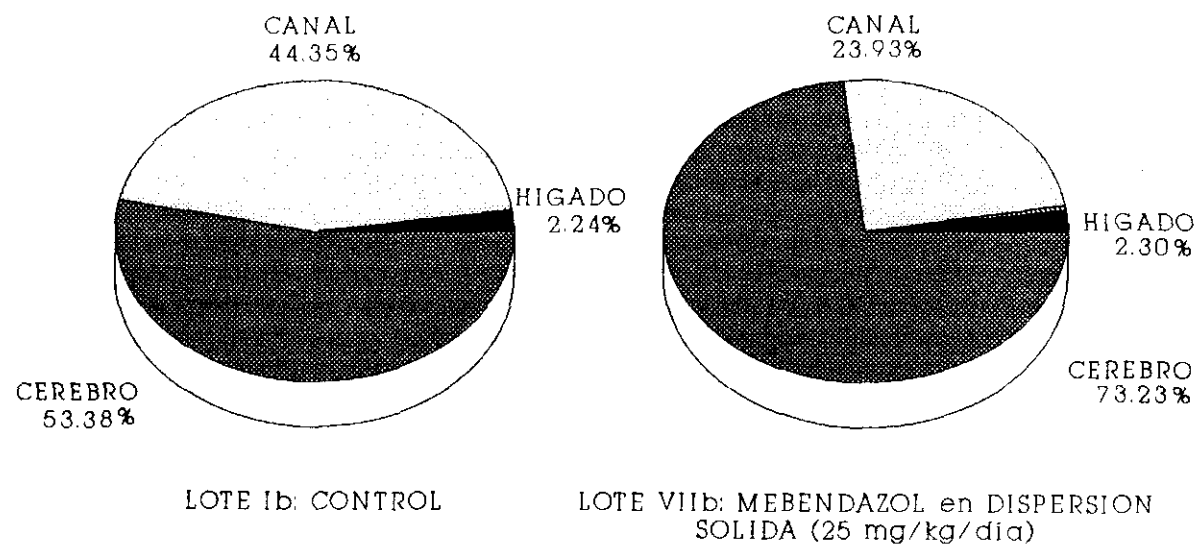
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

FIGURA 29
% Larvas por órgano



Tratamiento en fase miotrópica-neurotrópica

4.2.1.2.6.- Tratamiento estadístico

	<u>Lote Ib: Control</u>			<u>Lote Iib: MBZc c.m.c.</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	2,248	1,812	6	8,79	6,862	2,228	2,258	0,05	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	0	0	6	0,847	2,074	2,228	2,074	0,05	NO
- <u>CANAL (% L)</u>	6	44,358	14,034	6	53,537	16,176	2,228	1,050	0,05	NO
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	53,38	13,890	6	36,815	14,017	2,228	2,056	0,05	NO
- <u>TOTAL (L)</u>	6	87,167	23,490	6	32	15,608	4,587	4,791	0,001	SI

MBZc c.m.c. Mebendazol comercial en carboximetilcelulosa
 % L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado
 L Número total de larvas recuperadas
 n Número de ratones
 \bar{x} Media aritmética de %L ó de L
 D.S. Desviación standard
 "t" teór. "t" de Student teórica
 "t" real "t" de Student real
 P Probabilidad
 Sig. Significativo

Lote Ib: Control

Lote IIb: MBZ c.m.c.

(100 mg/kg/día)

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	2,248	1,812	6	2,138	2,555	2,281	0,860	0,05	NO
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	0	0	6	1,733	1,348	2,281	3,149	0,05	SI
<u>- CANAL (% L)</u>	6	44,358	14,034	6	43,788	8,142	2,228	0,086	0,05	NO
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	53,38	13,890	6	52,33	9,190	2,228	0,154	0,05	NO
<u>- TOTAL (L)</u>	6	87,167	23,490	6	37,667	3,386	4,587	5,109	0,001	SI

MBZ c.m.c. Mebendazol en carboximetilcelulosa

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Lote Ib: Control

Lote IVb: MBZ a.

(100 mg/kg/día)

	n	\bar{x}	D.S.	n	\bar{x}	D.S.	"t" teor.	"t" real	P <	Sig.
- HIGADO (% L)	6	2,248	1,812	6	1,405	1,337	2,228	0,917	0,05	NO
- PULMONES (% L)	6	0	0	6	0,193	0,474	2,228	1	0,05	NO
- CANAL (% L)	6	44,358	14,034	6	52,92	4,591	2,228	1,420	0,05	NO
- CEREBRO (% L)	6	53,38	13,890	6	45,47	5,092	2,228	1,310	0,05	NO
- TOTAL (L)	6	87,167	23,490	6	67	16,273	2,228	1,729	0,05	NO

MBZ a. Mebendazol en agua

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teor. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Lote Ib: Control

Lote Vb: MBZ d.s.

(100 mg/kg/día)

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	2,248	1,812	6	8,267	15,05	2,228	0,973	0,05	NO
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	0	0	6	0	0	2,228	0	0,05	NO
- <u>CANAL (% L)</u>	6	44,358	14,034	6	35,09	15,26	2,228	1,095	0,05	NO
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	53,38	13,890	6	56,63	12,248	2,228	0,335	0,05	NO
- <u>TOTAL (L)</u>	6	87,167	23,490	6	29,667	12,242	4,587	5,317	0,001	SI

MBZ d.s. Mebendazol en dispersión sólida

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Lote Ib: Control

Lote Vlb: MBZ d.s.

(50 mg/kg/día)

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teor.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	2,248	1,812	5	2,228	3,104	2,262	0,013	0,05	NO
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	0	0	5	0	0	2,262	0	0,05	NO
- <u>CANAL (% L)</u>	6	44,358	14,034	5	35,956	16,896	2,262	0,903	0,05	NO
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	53,38	13,890	5	61,80	16,196	2,262	0,930	0,05	NO
- <u>TOTAL (L)</u>	6	87,167	23,490	5	33	10,198	3,690	4,763	0,005	SI

MBZ d.s. Mebendazol en dispersión sólida

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teor. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Lote Ib: Control

Lote VIId: MBZ d.s.

(25 mg/kg/día)

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	2,248	1,812	6	2,305	2,768	2,228	0,041	0,05	NO
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	0	0	6	0,52	1,274	2,228	1	0,05	NO
- <u>CANAL (% L)</u>	6	44,358	14,034	6	23,933	9,024	2,228	2,998	0,05	SI
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	53,38	13,890	6	73,23	8,445	2,228	2,991	0,05	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	6	87,167	23,490	6	37,33	9,352	4,587	4,828	0,001	SI

MBZ d.s. Mebendazol en dispersión sólida

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

TABLA LXXI
CUADRO RESUMEN

$\bar{x} L$ $\bar{x} \% L$	Lote Ib	Lote IIb	Lote IIIb	Lote IVb	Lote Vb	Lote VIb	Lote VIIb
HIGADO	1,83 2,24	2,66 8,79	0,83 2,13	1,00 1,40	1,50 8,26	0,80 2,22	0,83 2,30
PULMONES	0 0	0,50 0,84	0,66 1,73	0,16 0,19	0 0	0 0	0,16 0,52
CANAL	41,00 44,35	17,83 53,53	16,66 43,78	35,33 52,92	11,33 35,09	12,80 35,95	9,33 23,93
CEREBRO	44,33 53,38	11,00 36,81	19,50 52,33	30,50 45,47	16,83 56,63	19,40 61,80	27,00 73,23
TOTAL	87,16	32,00	37,66	67,00	29,66	33,00	37,33

$\bar{x} L$ = Media del número de larvas recuperadas por digestión

$\bar{x} \% L$ = Media del porcentaje de larvas respecto al total recuperado

Lote Ib = Control

Lote IIb = Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IIIb = Mebendazol en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

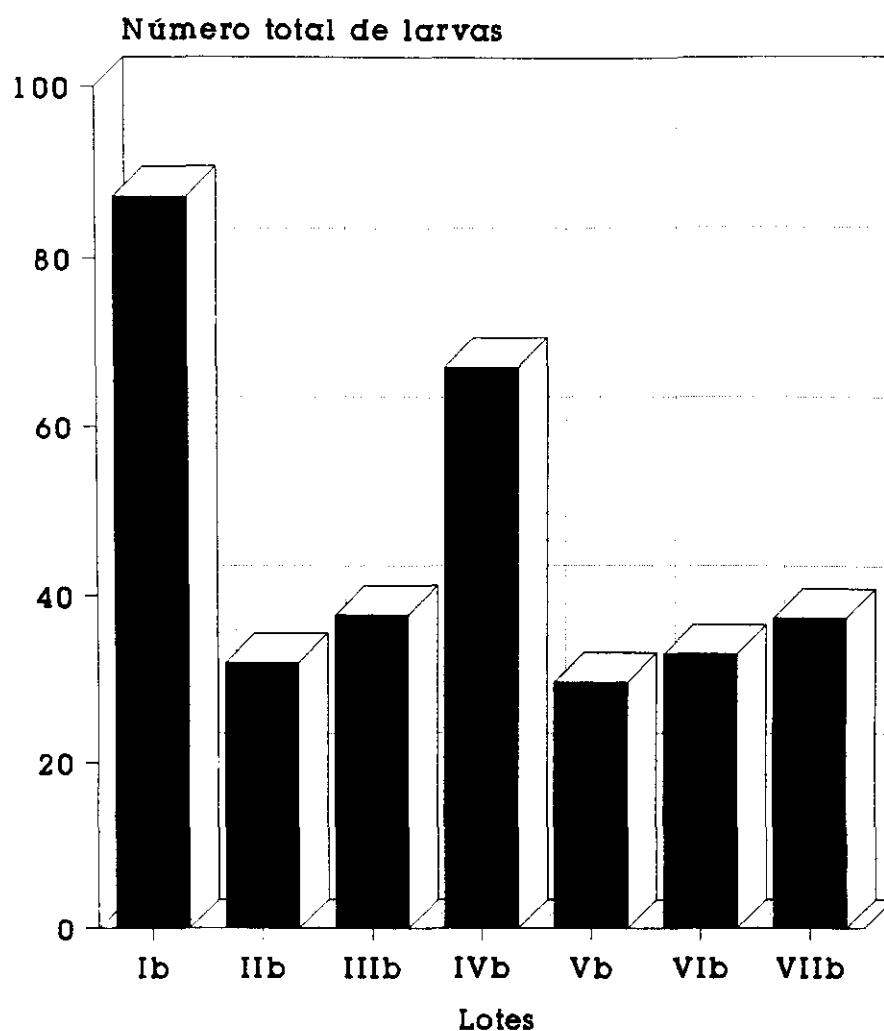
Lote IVb = Mebendazol en agua (100 mg/kg/día)

Lote Vb = Mebendazol en dispersión sólida (100 mg/kg/día)

Lote VIb = Mebendazol en dispersión sólida (50 mg/kg/día)

Lote VIIb = Mebendazol en dispersión sólida (25 mg/kg/día)

FIGURA 30
CARGA PARASITARIA TOTAL



Tratamiento en fase miotrópica-neurotrópica

Lote Ib = Control

Lote IIb = Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IIIb = Mebendazol en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IVb = Mebendazol en agua (100 mg/kg/día)

Lote Vb = Mebendazol en dispersión sólida (100 mg/kg/día)

Lote VIb = Mebendazol en dispersión sólida (50 mg/kg/día)

Lote VIIb = Mebendazol en dispersión sólida (25 mg/kg/día)

4.2.2.- EVALUACION MEDIANTE ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL

4.2.2.1.- ESTUDIO DE ANTICUERPOS

4.2.2.1.1.- Frente al antígeno excretor-secretor larvario

4.2.2.1.1.1.- Lote Ib: Control

TABLA LXXII
Lote Ib: Control

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,406	0,380	0,878	0,944	0,980	1,054	1,082	1,086
Ag E/S	0,470	0,421	0,918	0,952	1,003	1,041	1,028	1,028
D.O.	0,243	0,133	0,201	0,160	0,166	0,161	0,164	0,137
B.S.A.	0,150	0,106	0,143	0,092	0,104	0,130	0,102	0,108
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,242	0,281	0,726	0,822	0,856	0,902	0,922	0,935
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	1,16	3	3,39	3,53	3,72	3,80	3,86

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$ = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/250

4.2.2.1.1.2.- Lote I Ib: Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa

TABLA LXXIII
Lote I Ib: MBZc c.m.c. (100 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,406	0,297	0,759	0,762	0,792	0,954	0,955	1,019
Ag E/S	0,470	0,325	0,767	0,811	0,857	0,970	0,981	1,009
D.O.	0,243	0,117	0,191	0,128	0,125	0,127	0,129	0,120
B.S.A.	0,150	0,119	0,168	0,122	0,111	0,122	0,114	0,120
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,242	0,193	0,584	0,661	0,706	0,838	0,847	0,894
I D.O.p D.O.t	-----	0,79	2,41	2,73	2,91	3,46	3,50	3,69

MBZc c.m.c. = Mebendazol comercial en carboximetilcelulosa

Sem p.i. = Semanas postinoculación

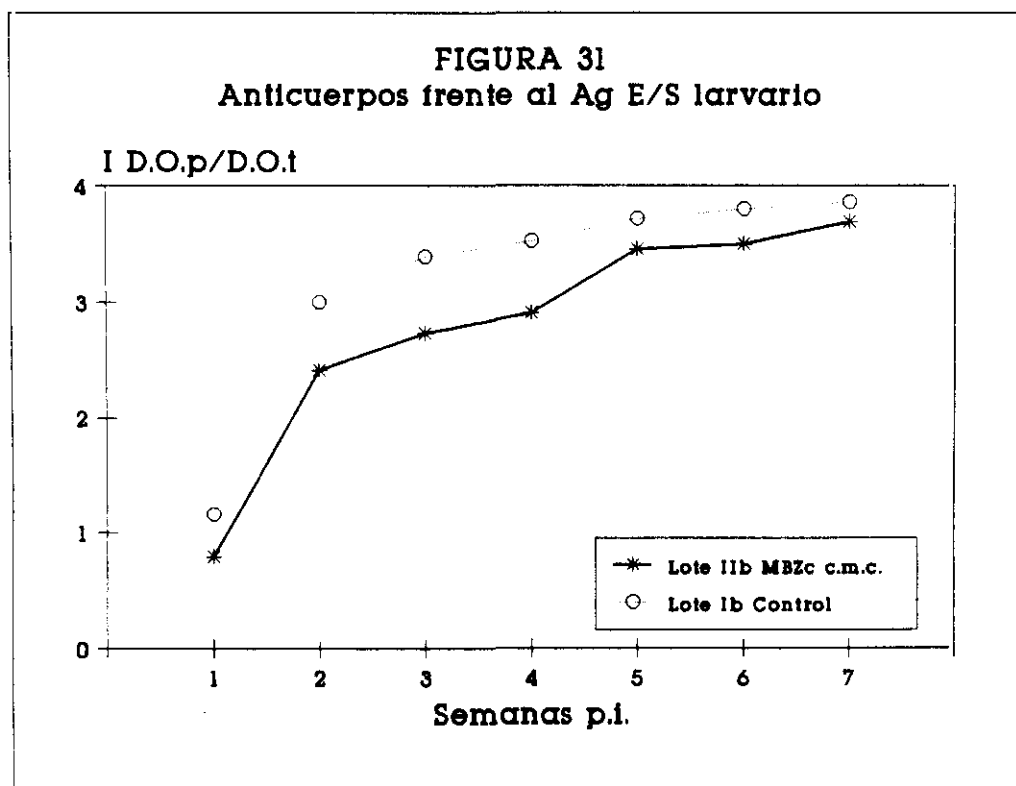
D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/250



4.2.2.1.1.3.- Lote IIIb: Mebendazol en carboximetilcelulosa

TABLA LXXIV

Lote IIIb: MBZ c.m.c. (100 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,396	0,443	0,791	0,883	0,936	1,000	1,049	1,031
Ag E/S	0,359	0,473	0,810	0,822	0,910	1,000	1,052	1,063
D.O.	0,138	0,174	0,280	0,146	0,142	0,143	0,160	0,126
B.S.A.	0,106	0,108	0,280	0,125	0,125	0,140	0,156	0,118
D.O. X-B.S.A.	0,255	0,317	0,520	0,717	0,790	0,859	0,892	0,925
I D.O.p D.O.t	-----	1,24	2,03	2,81	3,09	3,36	3,49	3,62

MBZ c.m.c. = Mebendazol en carboximetilcelulosa

Sem p.i. = Semanas postinoculación

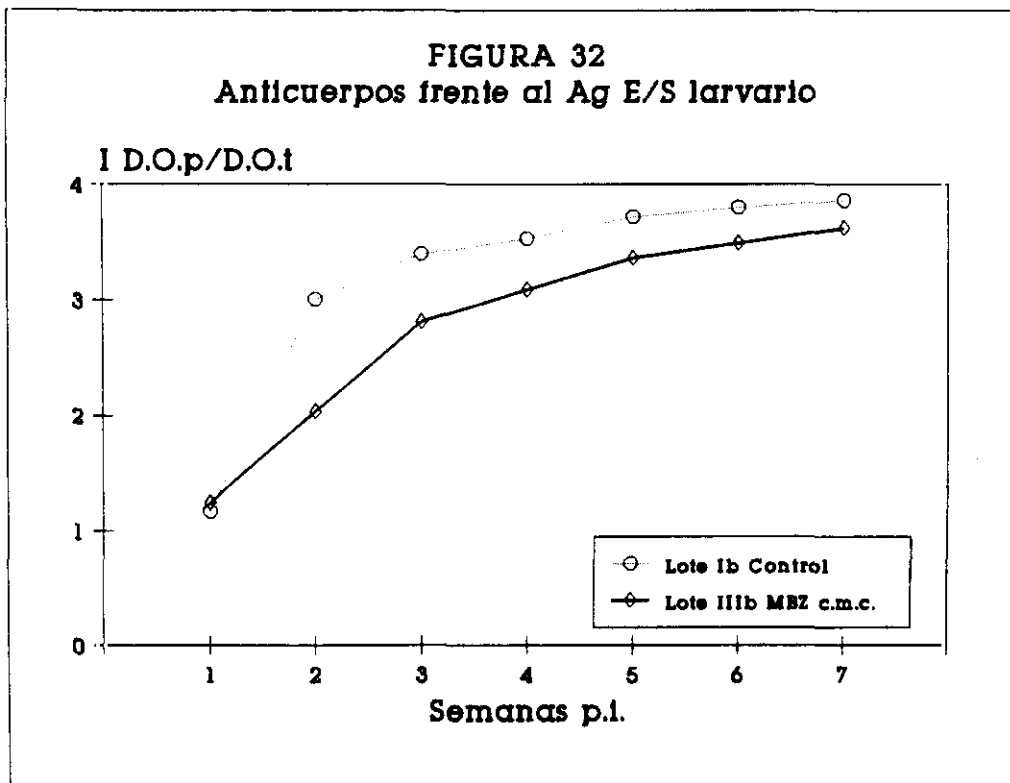
D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. X-B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/250



4.2.2.1.1.4.- Lote IVb: Mebendazol en agua

TABLA LXXV
Lote IVb: MBZ a. (100 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,396	0,375	0,718	0,818	0,858	0,931	1,032	0,976
Ag E/S	0,359	0,378	0,740	0,843	0,967	1,002	1,077	1,041
D.O.	0,138	0,172	0,185	0,154	0,155	0,147	0,134	0,167
B.S.A.	0,106	0,182	0,231	0,143	0,151	0,129	0,148	0,166
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,255	0,199	0,521	0,682	0,759	0,828	0,913	0,842
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	0,78	2,04	2,67	2,97	3,24	3,58	3,30

MBZ a. = Mebendazol en agua

Sem p.i. = Semanas postinoculación

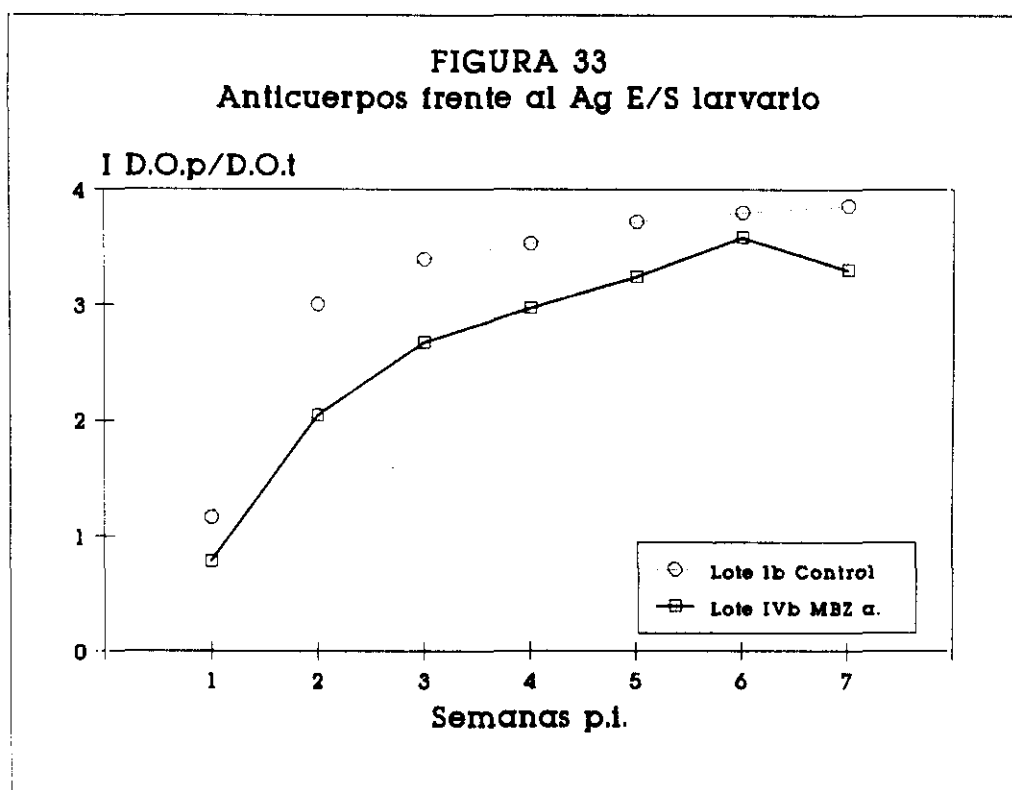
D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente al la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/250



4.2.2.1.1.5.- Lotes Vb, VIb y VIIb: Mebendazol en dispersión sólida

TABLA LXXVI

Lote Vb: MBZ d.s. (100 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,367	0,395	0,720	0,919	1,071	1,077	1,067	1,110
Ag E/S	0,351	0,437	0,706	0,874	1,046	1,033	1,050	1,080
D.O.	0,179	0,158	0,181	0,218	0,165	0,195	0,184	0,176
B.S.A.	0,139	0,218	0,197	0,226	0,114	0,126	0,172	0,163
D.O.	0,200	0,228	0,524	0,674	0,919	0,895	0,880	0,926
\bar{X} -B.S.A.								
I D.O.p	-----	1,14	2,62	3,37	4,59	4,47	4,40	4,63
D.O.t								

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/250

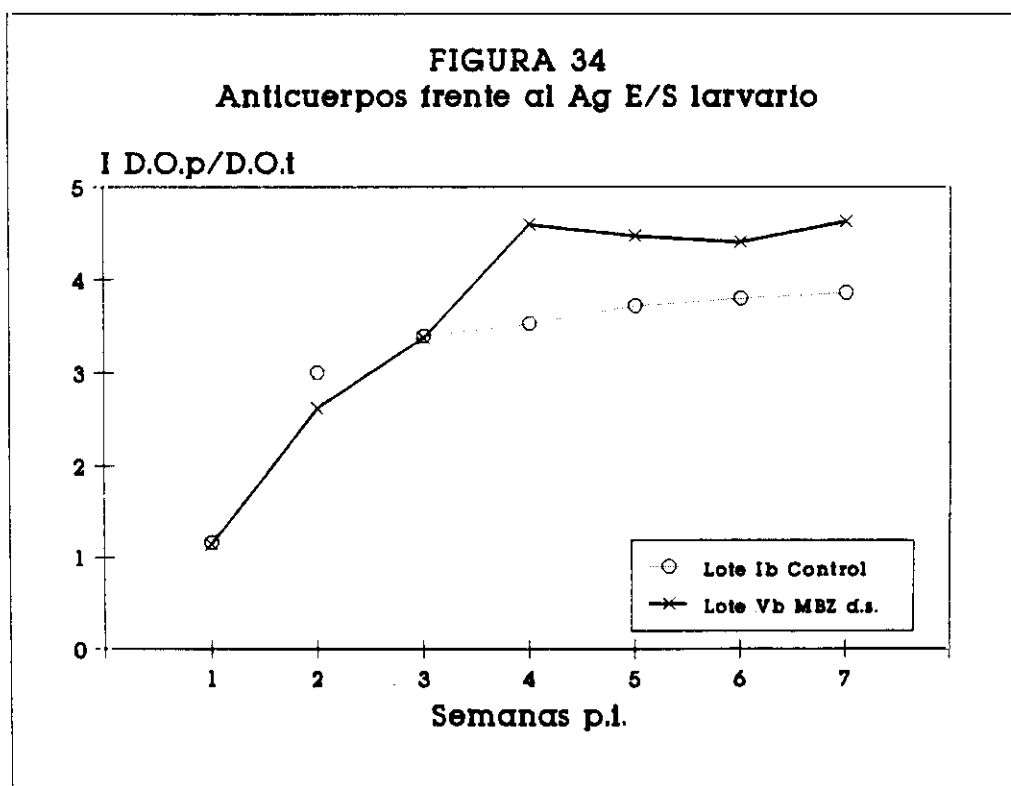


TABLA LXXVII

Lote VIb: MBZ d.s. (50 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,367	0,410	0,916	0,976	0,958	1,023	1,055	1,086
Ag E/S	0,351	0,421	0,943	0,968	1,063	1,055	1,095	1,152
D.O.	0,179	0,166	0,157	0,170	0,132	0,172	0,206	0,156
B.S.A.	0,139	0,136	0,140	0,139	0,106	0,122	0,129	0,138
D.O.	0,200	0,264	0,781	0,818	0,891	0,892	0,908	0,972
\bar{X} -B.S.A.								
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	1,32	3,90	4,09	4,45	4,46	4,54	4,86

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$ = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado 1/250

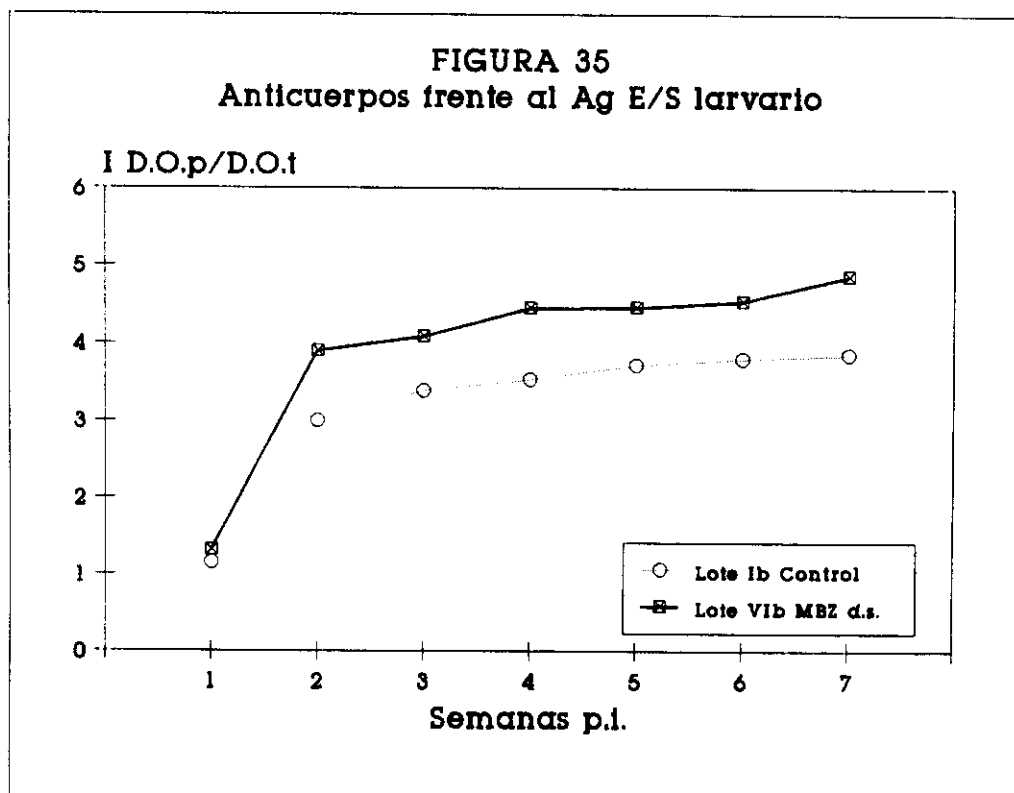


TABLA LXXVIII

Lote VIIb: MBZ d.s. (25 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,367	0,439	0,821	0,976	1,052	1,069	1,103	1,114
Ag E/S	0,351	0,479	0,868	1,032	1,082	1,095	1,115	1,132
D.O.	0,179	0,229	0,215	0,265	0,278	0,227	0,216	0,183
B.S.A.	0,139	0,122	0,215	0,247	0,188	0,164	0,139	0,156
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,200	0,284	0,629	0,748	0,834	0,887	0,932	0,954
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	1,42	3,14	3,74	4,17	4,43	4,66	4,77

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

Sem p.i. = Semanas postinoculación

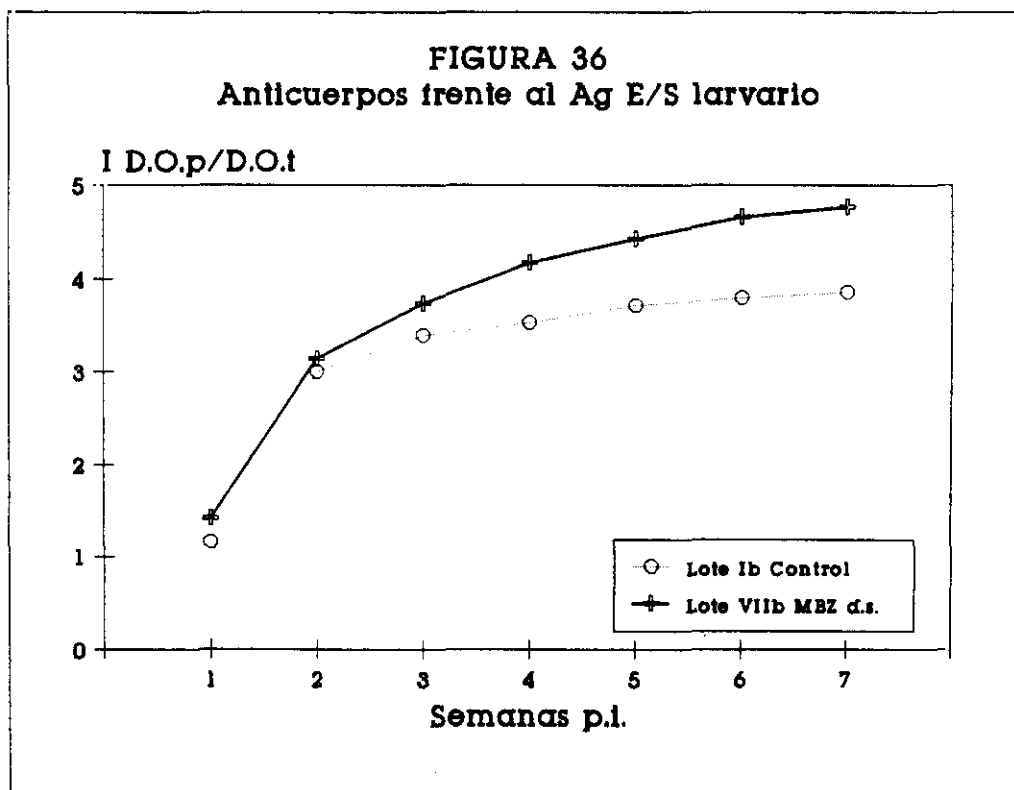
D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

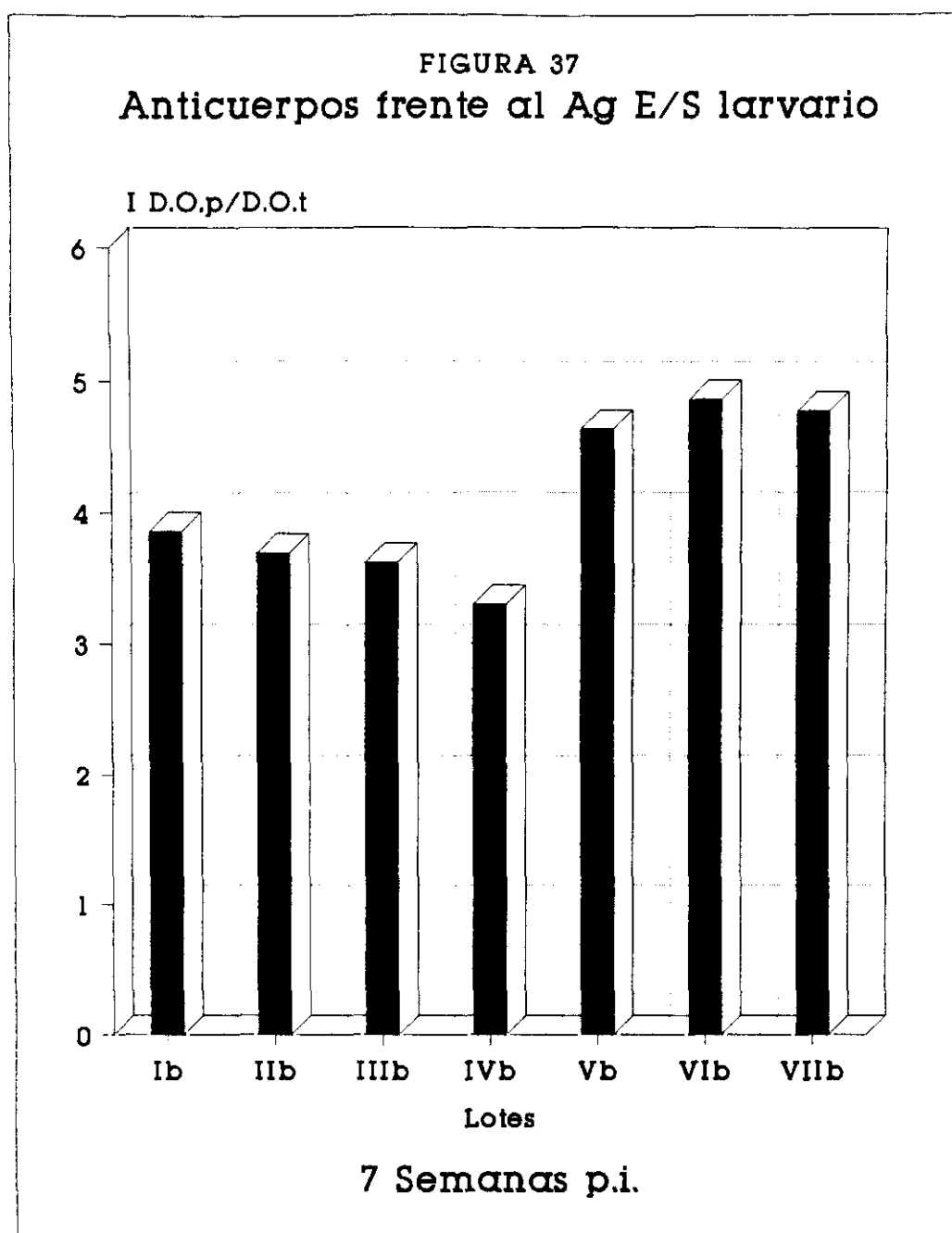
D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/250



4.2.2.1.1.6.- Representación conjunta



Lote Ib = Control

Lote IIb = Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IIIb = Mebendazol en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IVb = Mebendazol en agua (100 mg/kg/día)

Lote Vb = Mebendazol en dispersión sólida (100 mg/kg/día)

Lote VIb = Mebendazol en dispersión sólida (50 mg/kg/día)

Lote VIIb = Mebendazol en dispersión sólida (25 mg/kg/día)

4.2.2.1.2.- Frente al antígeno total larvario

4.2.2.1.2.1.- Lote Ib: Control

TABLA LXXIX
Lote Ib: Control

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,218	0,527	0,667	0,587	0,522	0,600	0,590	0,667
AgT _L	0,186	0,503	0,618	0,568	0,518	0,563	0,502	0,622
D.O.	0,024	0,029	0,034	0,031	0,031	0,034	0,027	0,028
B.S.A.	0,027	0,026	0,029	0,028	0,028	0,029	0,024	0,028
D.O.	0,177	0,488	0,611	0,548	0,491	0,550	0,521	0,616
\bar{X} -B.S.A.								
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	----	2,75	3,45	3,09	2,77	3,10	2,94	3,48

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. AgT_L = Densidad óptica frente al antígeno total larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$ = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500

4.2.2.1.2.2.- Lote IIb: Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa

TABLA LXXX

Lote IIb: MBZc c.m.c. (100 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,218	0,317	0,632	0,520	0,475	0,616	0,427	0,517
AgT _L	0,186	0,296	0,620	0,573	0,476	0,581	0,439	0,566
D.O.	0,024	0,010	0,014	0,011	0,018	0,022	0,012	0,019
B.S.A.	0,027	0,021	0,028	0,018	0,019	0,034	0,019	0,026
D.O.	0,177	0,291	0,605	0,532	0,457	0,570	0,418	0,519
\bar{X} -B.S.A.								
I D.O.p/D.O.t	----	1,64	3,41	3,00	2,58	3,22	2,36	2,93

MBZc c.m.c. = Mebendazol comercial en carboximetilcelulosa

Sem p.i. = Semanas postinoculación

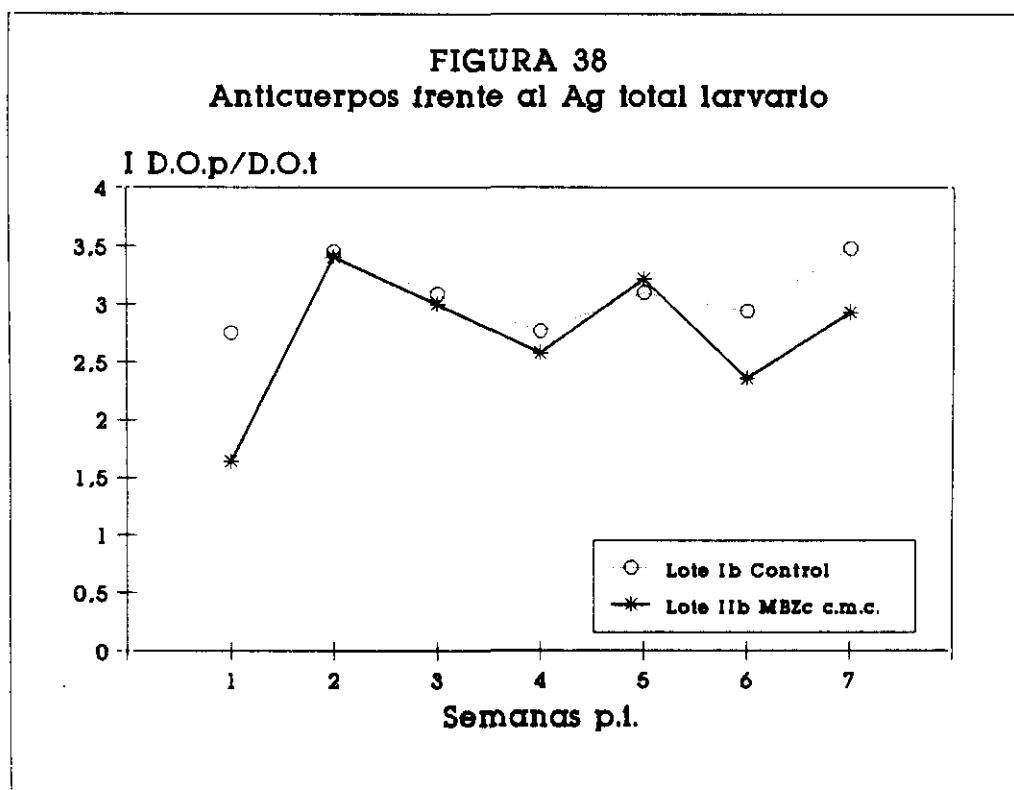
D.O. AgT_L = Densidad óptica frente al antígeno total larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500



4.2.2.1.2.3.- Lote IIIb: Mebendazol en carboximetilcelulosa

TABLA LXXXI
Lote IIIb: MBZ c.m.c. (100 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,199	0,376	0,509	0,524	0,483	0,427	0,493	0,653
AgT _L	0,172	0,340	0,519	0,493	0,444	0,399	0,481	0,649
D.O.	0,010	0,032	0,025	0,019	0,021	0,026	0,021	0,026
B.S.A.	0,011	0,019	0,021	0,021	0,022	0,013	0,019	0,019
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,175	0,333	0,491	0,488	0,442	0,394	0,467	0,629
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	----	1,90	2,80	2,78	2,52	2,25	2,66	3,59

MBZ c.m.c. = Mebendazol en carboximetilcelulosa

Sem p.i. = Semanas postinoculación

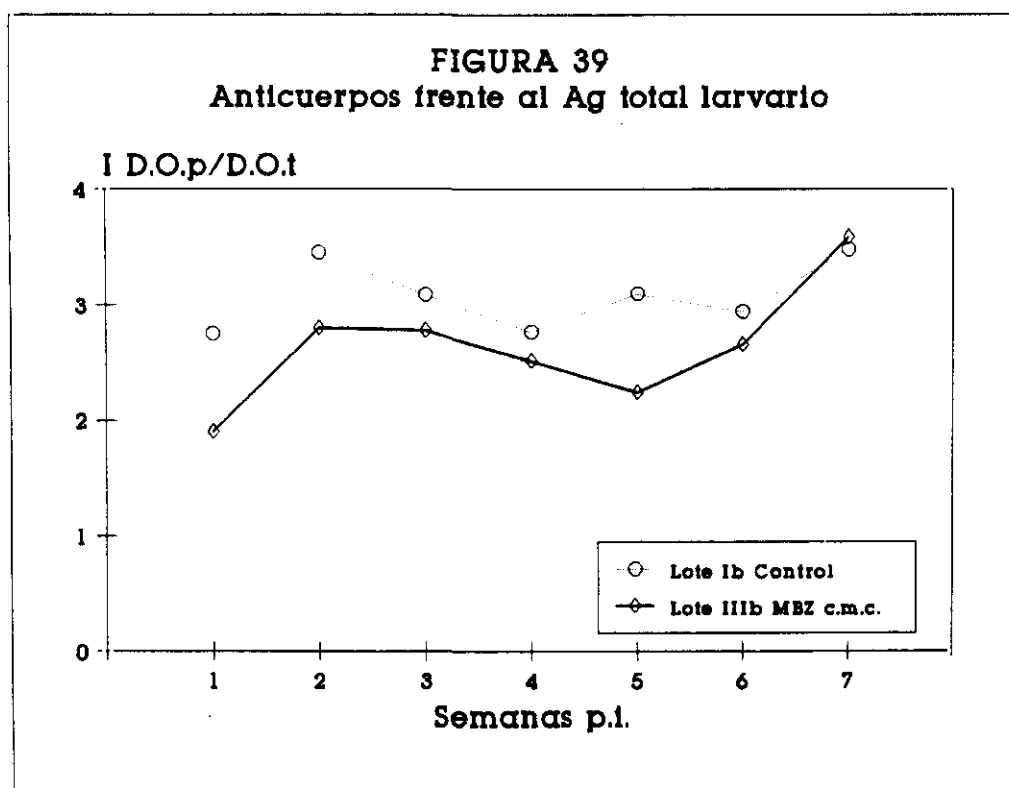
D.O. AgT_L = Densidad óptica frente al antígeno total larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500



4.2.2.1.2.4.- Lote IVb: Mebendazol en agua

TABLA LXXXII
Lote IVb: MBZ a. (100 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,199	0,363	0,525	0,527	0,537	0,435	0,538	0,683
AgT _L	0,172	0,365	0,484	0,477	0,519	0,427	0,537	0,593
D.O.	0,010	0,013	0,014	0,012	0,012	0,008	0,011	0,021
B.S.A.	0,011	0,026	0,021	0,022	0,031	0,014	0,028	0,032
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,175	0,345	0,487	0,485	0,507	0,420	0,518	0,612
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	1,97	2,78	2,77	2,89	2,40	2,96	3,49

MBZ a. = Mebendazol en agua

Sem p.i. = Semanas postinoculación

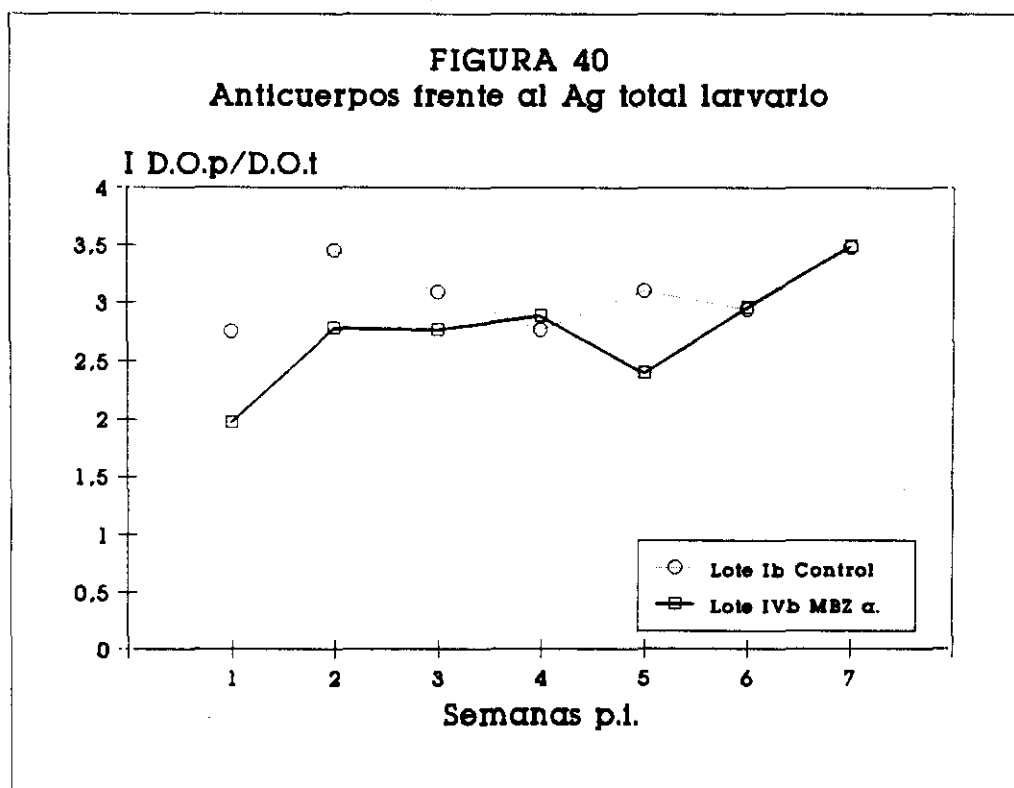
D.O. AgT_L = Densidad óptica frente al antígeno total larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500



4.2.2.1.2.5.- Lotes Vb, VIb y VIIb: Mebendazol en dispersión sólida

TABLA LXXXIII

Lote Vb: MBZ d.s. (100 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,169	0,465	0,539	0,529	0,590	0,496	0,503	0,621
AgT _L	0,148	0,428	0,491	0,428	0,560	0,480	0,460	0,649
D.O.	0,011	0,012	0,014	0,015	0,020	0,014	0,021	0,026
B.S.A.	0,009	0,010	0,016	0,013	0,015	0,013	0,008	0,017
D.O. X-B.S.A.	0,148	0,435	0,500	0,464	0,558	0,475	0,467	0,614
I D.O.p D.O.t	----	2,93	3,37	3,13	3,77	3,20	3,15	4,14

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. AgT_L = Densidad óptica frente al antígeno total larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. X-B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500

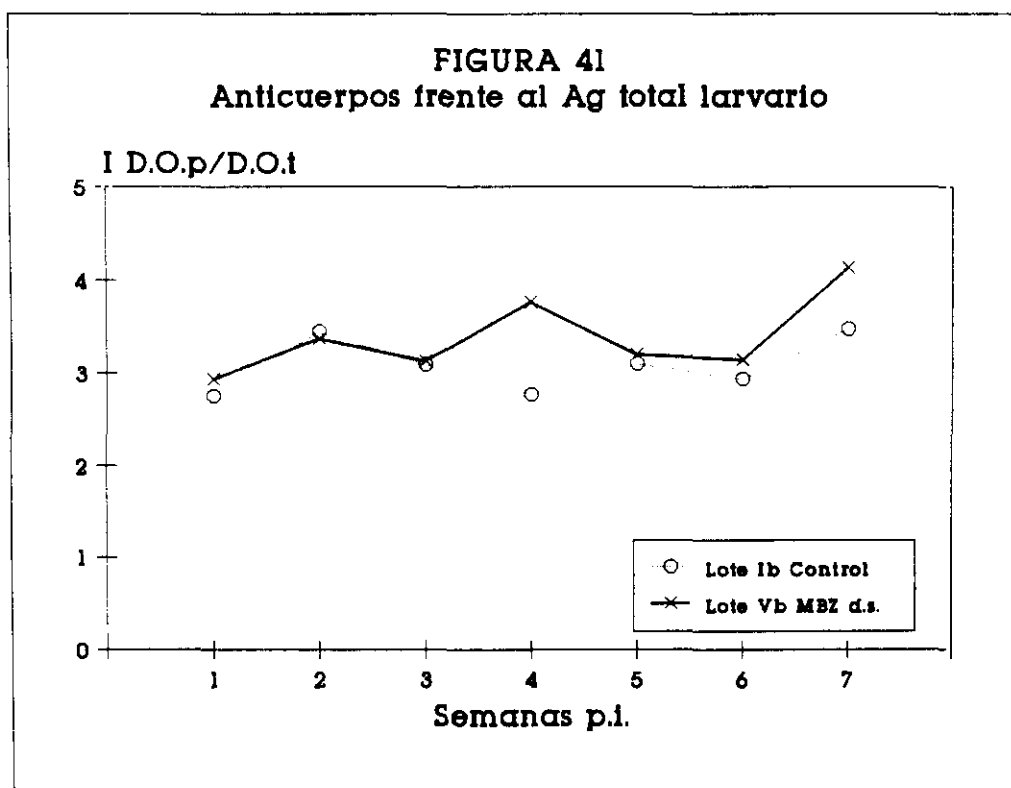


TABLA LXXXIV

Lote VIb: MBZ d.s. (50 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,169	0,346	0,468	0,409	0,480	0,618	0,537	0,697
AgT _L	0,148	0,354	0,411	0,427	0,503	0,533	0,404	0,533
D.O.	0,011	0,007	0,011	0,009	0,008	0,005	0,015	0,010
B.S.A.	0,009	0,014	0,023	0,023	0,023	0,024	0,030	0,020
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,148	0,340	0,422	0,402	0,476	0,561	0,448	0,600
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	----	2,29	2,85	2,71	3,21	3,79	3,02	4,05

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. AgT_L = Densidad óptica frente al antígeno total larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500

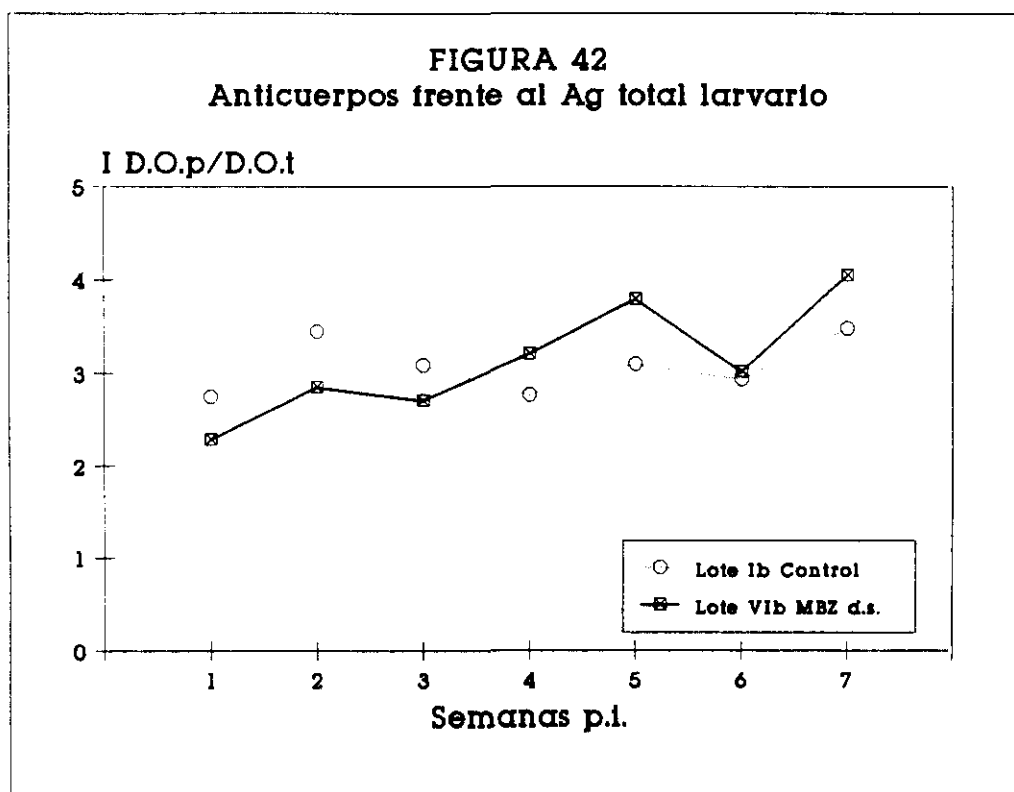


TABLA LXXXV

Lote VIIb: MBZ d.s. (25 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,194	0,517	0,577	0,583	0,591	0,568	0,604	0,670
AgT _L	0,160	0,471	0,552	0,491	0,543	0,527	0,558	0,656
D.O.	0,008	0,012	0,011	0,007	0,010	0,011	0,016	0,019
B.S.A.	0,004	0,011	0,010	0,005	0,004	0,004	0,017	0,013
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,171	0,483	0,554	0,531	0,560	0,540	0,565	0,647
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	----	2,82	3,23	3,10	3,27	3,15	3,30	3,78

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

Sem p.i. = Semanas postinoculación

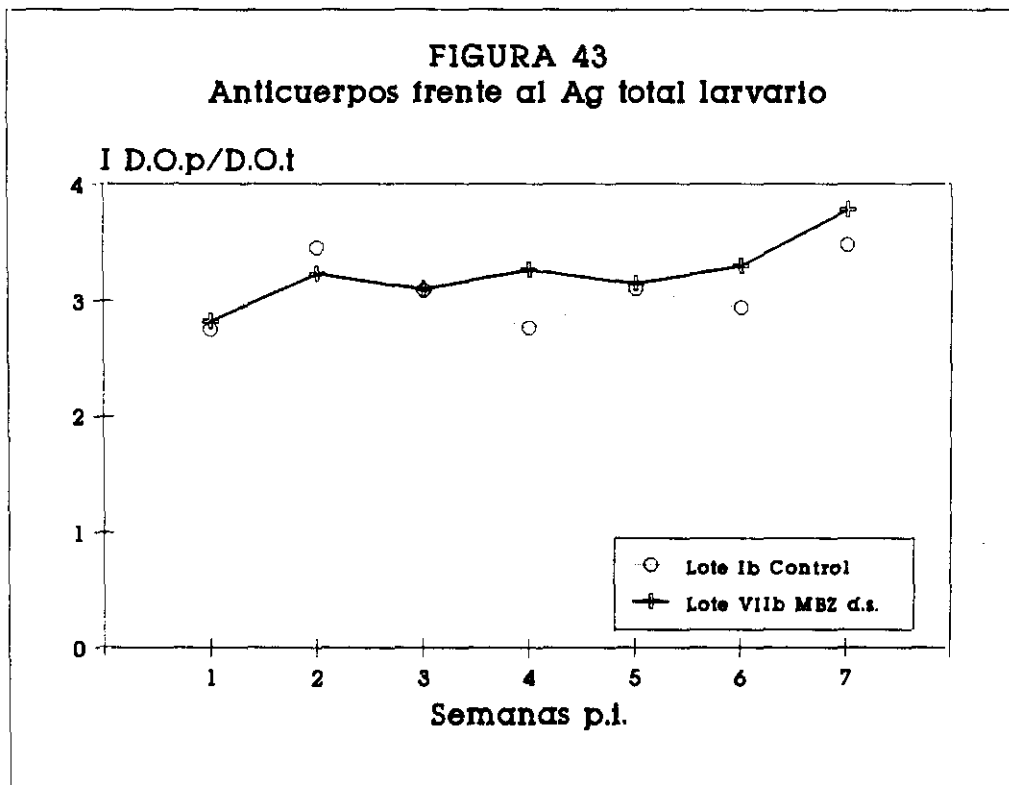
D.O. AgT_L = Densidad óptica frente al antígeno total larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

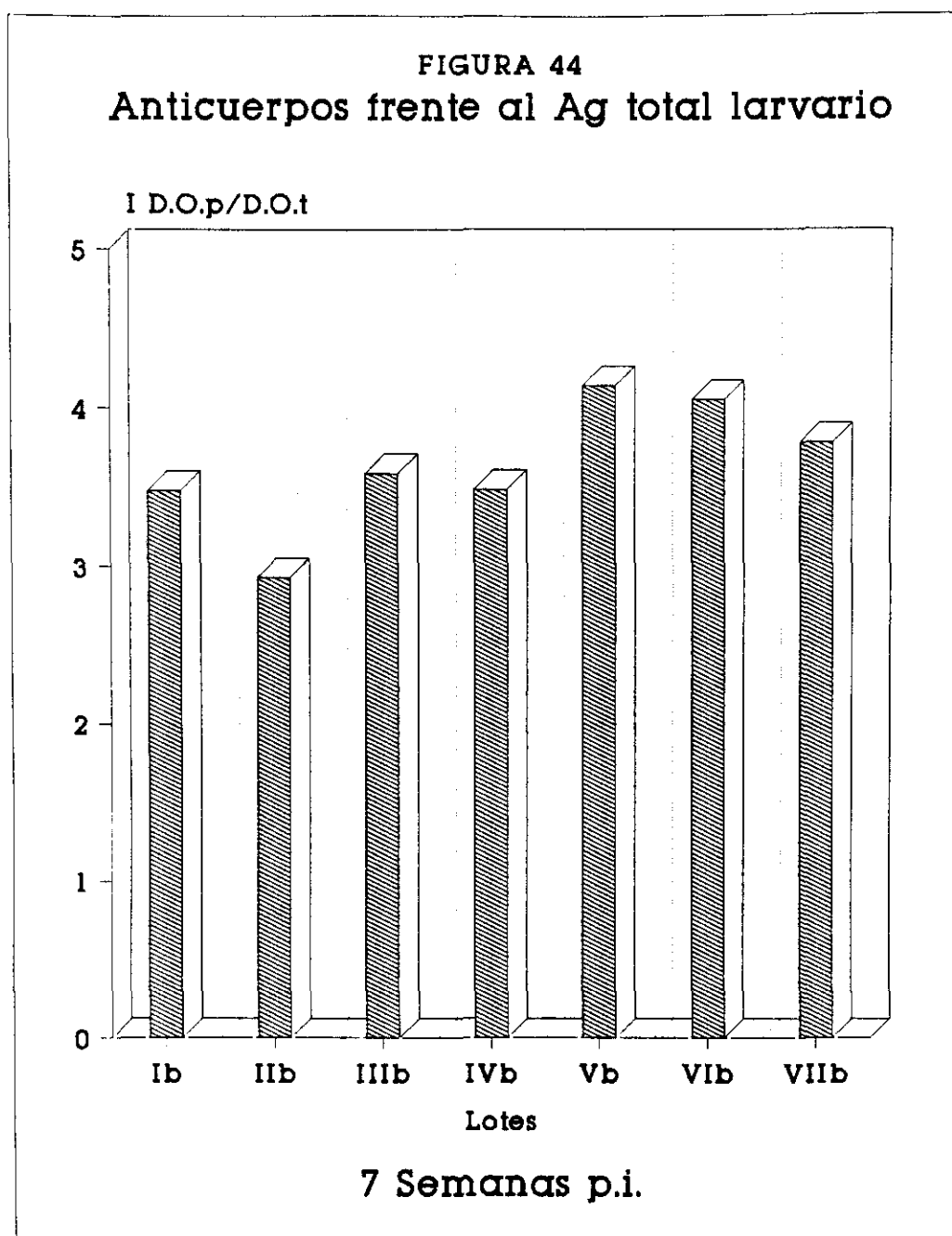
D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500



4.2.2.1.2.6.- Representación conjunta



Lote Ib = Control

Lote IIb = Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IIIb = Mebendazol en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IVb = Mebendazol en agua (100 mg/kg/día)

Lote Vb = Mebendazol en dispersión sólida (100 mg/kg/día)

Lote VIb = Mebendazol en dispersión sólida (50 mg/kg/día)

Lote VIIb = Mebendazol en dispersión sólida (25 mg/kg/día)

4.2.2.2.- ESTUDIO DE INMUNOCOMPLEJOS

4.2.2.2.1.- Lote Ib: Control

TABLA LXXXVI
Lote Ib: Control

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,402	0,647	0,809	0,828	0,873	0,816	0,880	0,923
SC aT	0,383	0,654	0,801	0,808	0,827	0,785	0,847	0,858
D.O.	0,291	0,262	0,293	0,255	0,301	0,267	0,258	0,294
B.S.A.	0,129	0,244	0,327	0,249	0,304	0,261	0,244	0,298
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,182	0,397	0,495	0,566	0,548	0,536	0,612	0,594
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	2,18	2,71	3,10	3,01	2,94	3,36	3,26

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. SC aT = Densidad óptica frente a suero de conejo anti-Toxocara

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente
a la B.S.A.

I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$ = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500

4.2.2.2.2.- Lote IIb: Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa

TABLA LXXXVII

Lote IIb: MBZc c.m.c. (100 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,329	0,369	0,426	0,350	0,404	0,380	0,344	0,379
SC aT	0,352	0,417	0,451	0,362	0,409	0,394	0,352	0,386
D.O.	0,165	0,233	0,307	0,206	0,218	0,172	0,183	0,181
B.S.A.	0,138	0,186	0,307	0,180	0,196	0,136	0,146	0,146
D.O.	0,189	0,184	0,131	0,163	0,199	0,233	0,184	0,219
\bar{X} -B.S.A.								
I D.O.p D.O.t	----	0,97	0,69	0,86	1,05	1,23	0,97	1,15

MBZc c.m.c. = Mebendazol comercial en carboximetilcelulosa

Sem p.i. = Semanas postinoculación

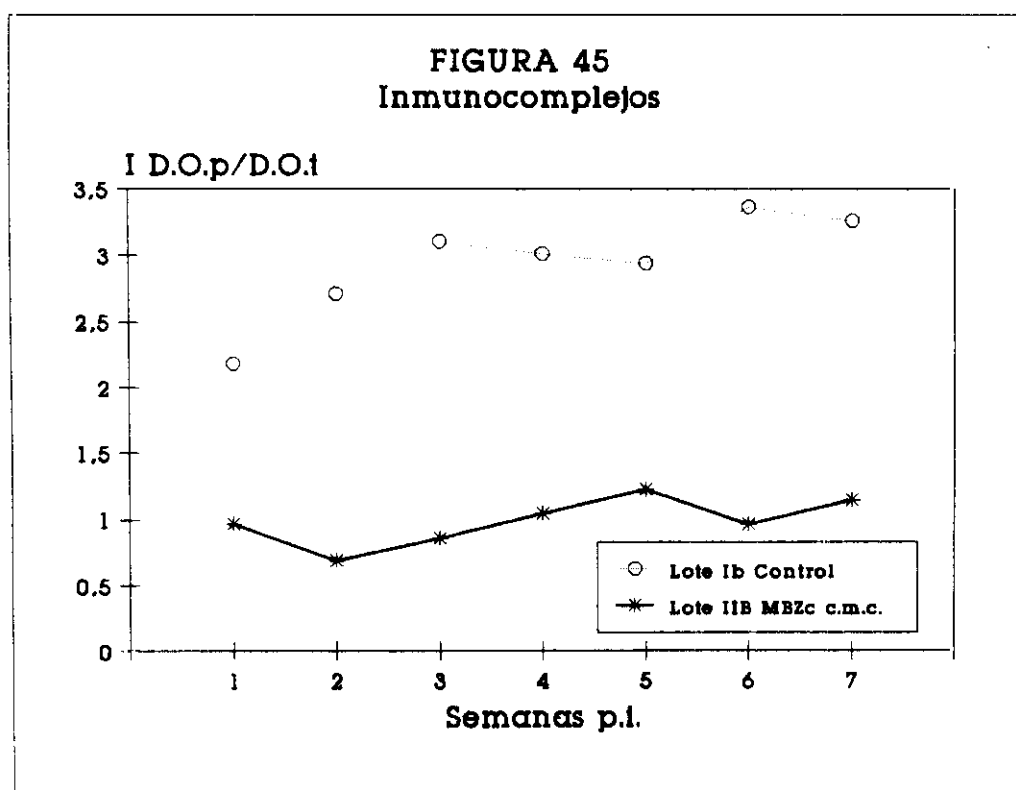
D.O. SC aT = Densidad óptica frente a suero de conejo anti-Toxocara

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500



4.2.2.2.3.- Lote IIIb: Mebendazol en carboximetilcelulosa

TABLA LXXXVIII

Lote IIIb: MBZ c.m.c. (100 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,329	0,598	0,632	0,611	0,582	0,449	0,548	0,680
SC aT	0,352	0,638	0,689	0,658	0,612	0,472	0,592	0,728
D.O.	0,165	0,207	0,271	0,197	0,213	0,195	0,185	0,192
B.S.A.	0,138	0,225	0,233	0,216	0,200	0,192	0,189	0,193
D.O.	0,189	0,402	0,408	0,428	0,391	0,267	0,383	0,512
\bar{X} -B.S.A.								
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	2,12	2,15	2,26	2,06	1,41	2,02	2,70

MBZ c.m.c. = Mebendazol en carboximetilcelulosa

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. SC aT = Densidad óptica frente a suero de conejo anti-Toxocara

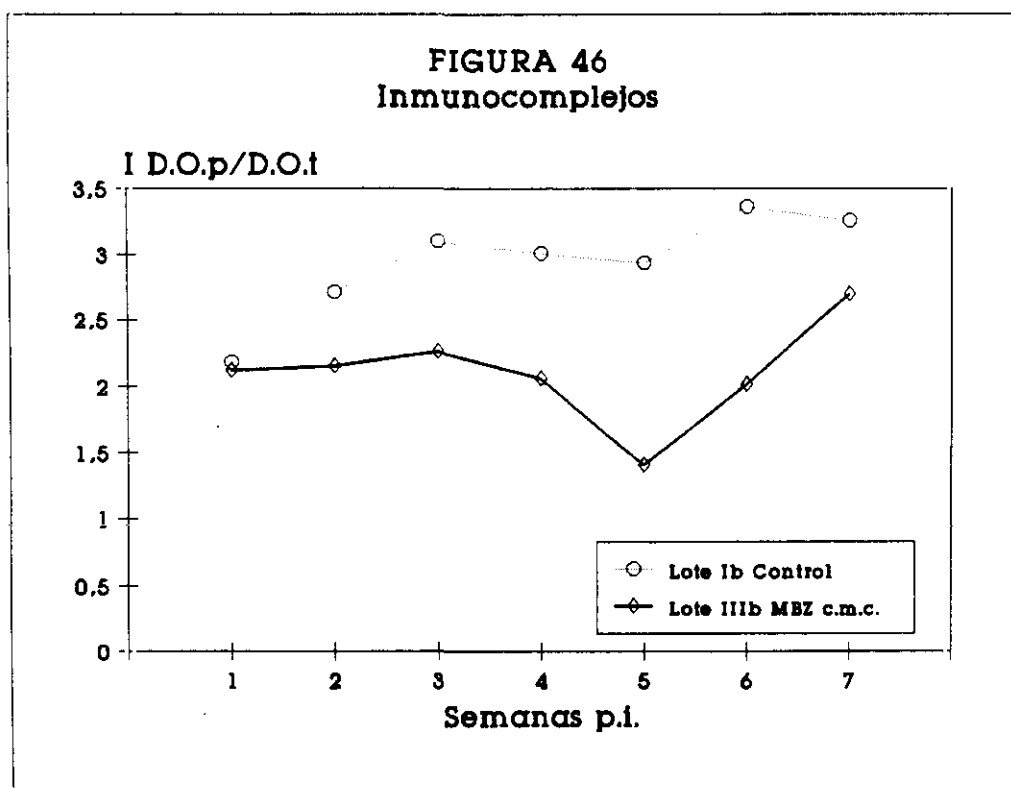
D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$ = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500

FIGURA 46
Inmunocomplejos



4.2.2.2.4.- Lote IVb: Mebendazol en agua

TABLA LXXXIX

Lote IVb: MBZ a. (100 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,496	0,755	0,692	0,760	0,661	0,597	0,695	0,835
SC aT	0,474	0,772	0,714	0,787	0,681	0,650	0,728	0,791
D.O.	0,348	0,396	0,402	0,411	0,297	0,335	0,361	0,374
B.S.A.	0,348	0,401	0,400	0,468	0,395	0,358	0,353	0,379
D.O.	0,137	0,365	0,302	0,334	0,325	0,277	0,354	0,437
\bar{X} -B.S.A.								
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	----	2,66	2,20	2,43	2,37	2,02	2,58	3,18

MBZ a. = Mebendazol en agua

Sem p.i. = Semanas postinoculación

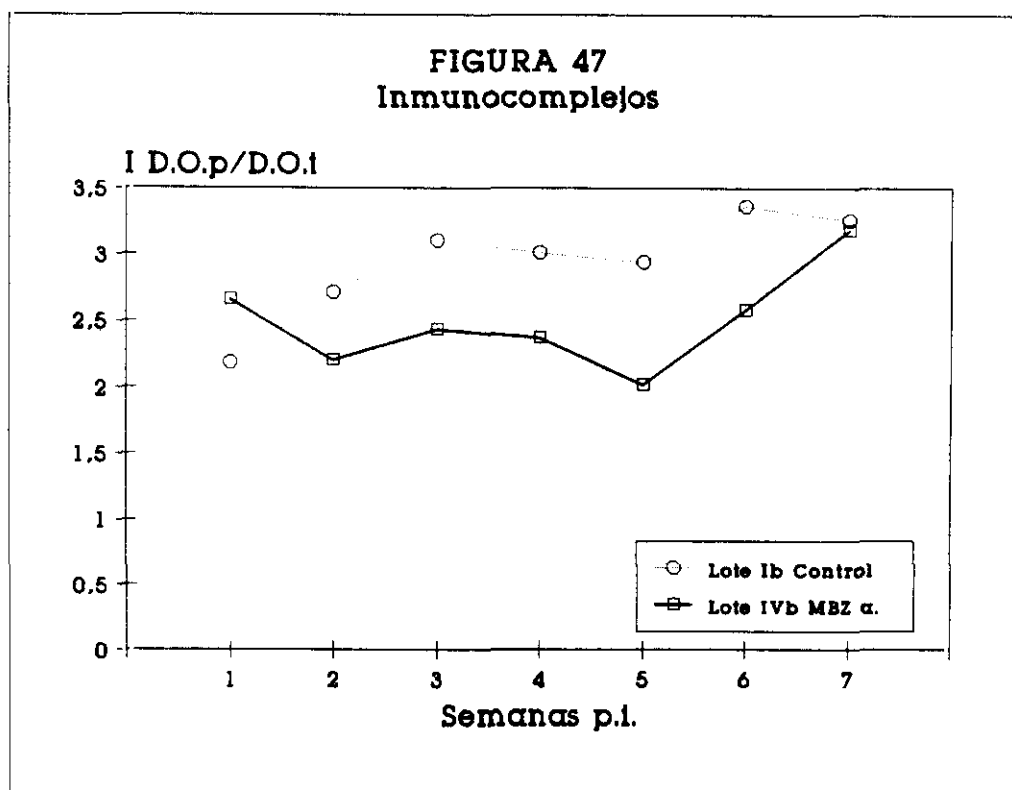
D.O. SC aT = Densidad óptica frente a suero de conejo anti-Toxocara

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$ = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500



4.2.2.2.5.- Lotes Vb, VIb y VIIb: Mebendazol en dispersión sólida

TABLA XC

Lote Vb: MBZ d.s. (100 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,496	0,725	0,699	0,759	0,731	0,737	0,793	0,745
SC aT	0,474	0,717	0,735	0,760	0,806	0,730	0,800	0,752
D.O.	0,348	0,467	0,446	0,495	0,423	0,406	0,435	0,397
B.S.A.	0,348	0,447	0,454	0,455	0,406	0,365	0,348	0,290
D.O.	0,137	0,264	0,267	0,284	0,354	0,348	0,405	0,405
\bar{X} -B.S.A.								
I D.O.p D.O.t	----	1,92	1,94	2,07	2,58	2,54	2,95	2,95

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. SC aT = Densidad óptica frente a suero de conejo anti-Toxocara

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O.testigo

Dilución del conjugado = 1/500

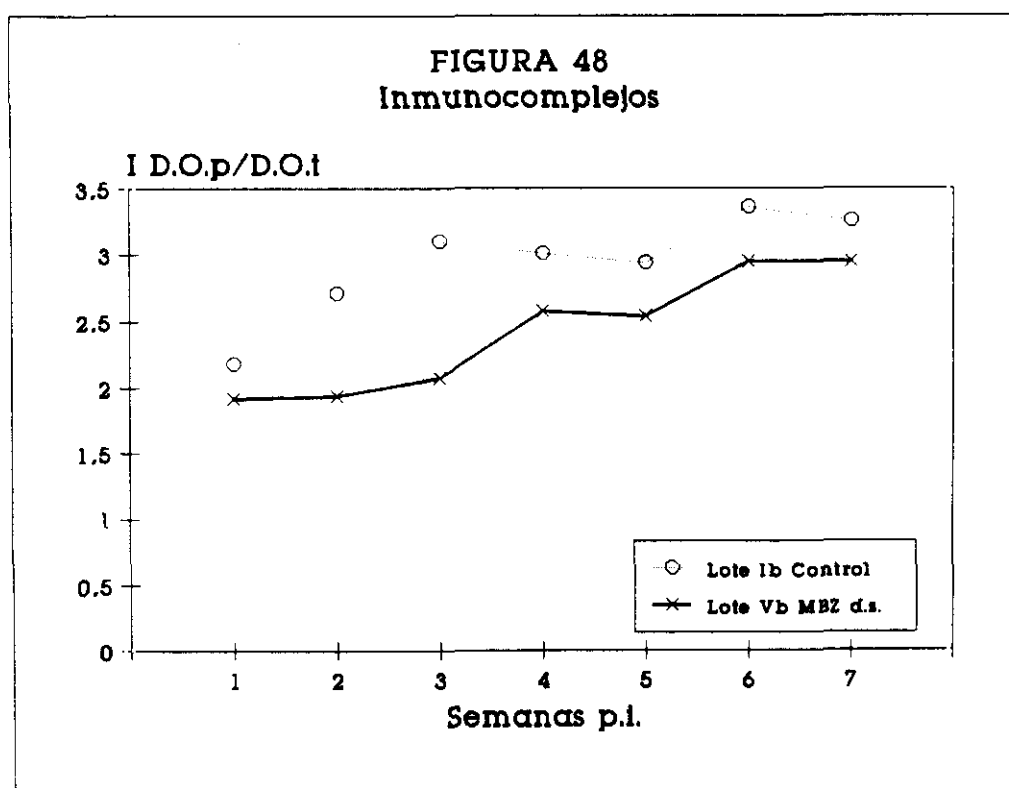


TABLA XCI

Lote VIb: MBZ d.s. (50 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,327	0,457	0,631	0,475	0,647	0,492	0,531	0,525
SC aT	0,334	0,509	0,611	0,503	0,597	0,565	0,548	0,495
D.O.	0,145	0,215	0,359	0,255	0,259	0,232	0,279	0,222
B.S.A.	0,140	0,185	0,383	0,200	0,258	0,196	0,206	0,227
D.O.	0,188	0,283	0,250	0,262	0,364	0,314	0,297	0,286
\bar{X} -B.S.A.								
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	----	1,50	1,32	1,39	1,93	1,67	1,57	1,52

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. SC aT = Densidad óptica frente a suero de conejo anti-Toxocara

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500

FIGURA 49
Inmunocomplejos

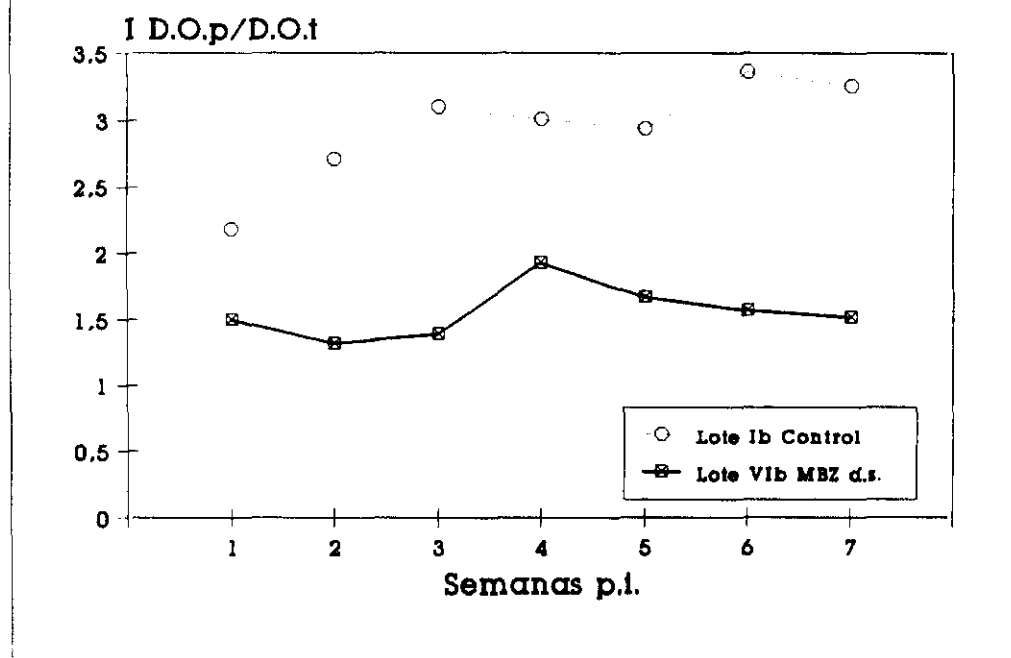


TABLA XCII
Lote VIIb: MBZ d.s. (25 mg/kg/día)

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7
D.O.	0,327	0,612	0,571	0,556	0,739	0,564	0,742	0,653
SC aT	0,334	0,693	0,601	0,620	0,762	0,598	0,787	0,699
D.O.	0,145	0,207	0,272	0,213	0,241	0,262	0,237	0,196
B.S.A.	0,140	0,231	0,276	0,217	0,227	0,262	0,218	0,183
D.O.	0,188	0,433	0,312	0,373	0,516	0,319	0,537	0,487
\bar{X} -B.S.A.								
I D.O.p D.O.t	----	2,30	1,65	1,98	2,74	1,69	2,85	2,59

MBZ d.s. = Mebendazol en dispersión sólida

Sem p.i. = Semanas postinoculación

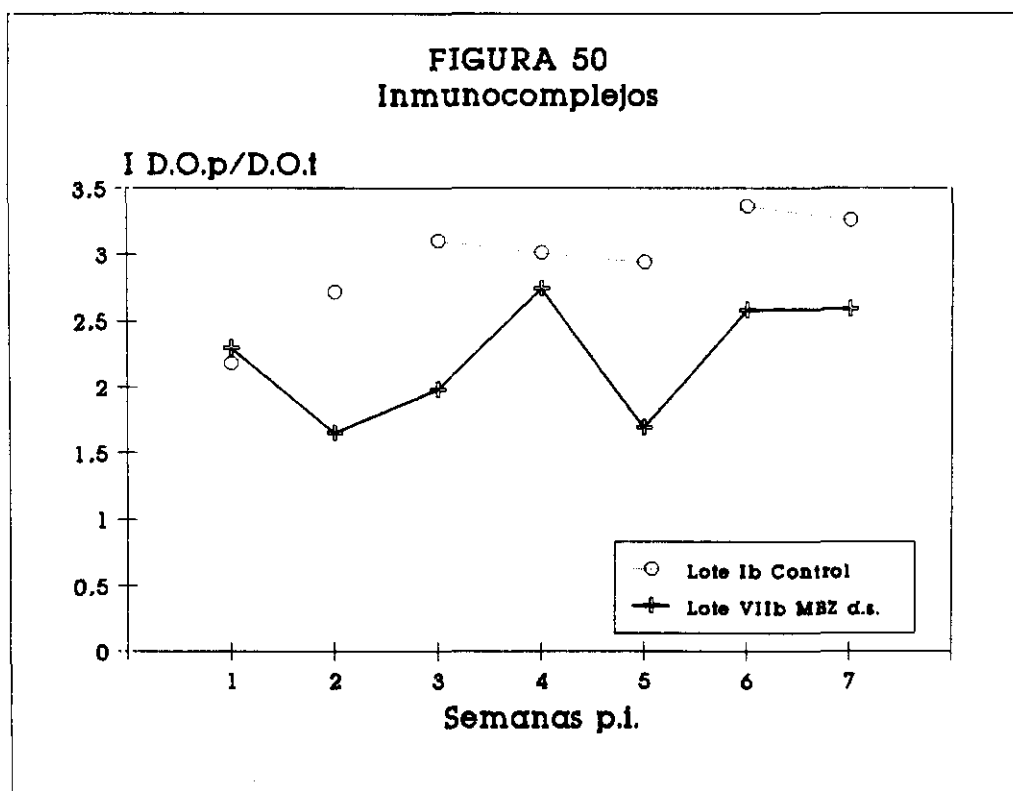
D.O. SC aT = Densidad óptica frente a suero de conejo anti-Toxocara

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

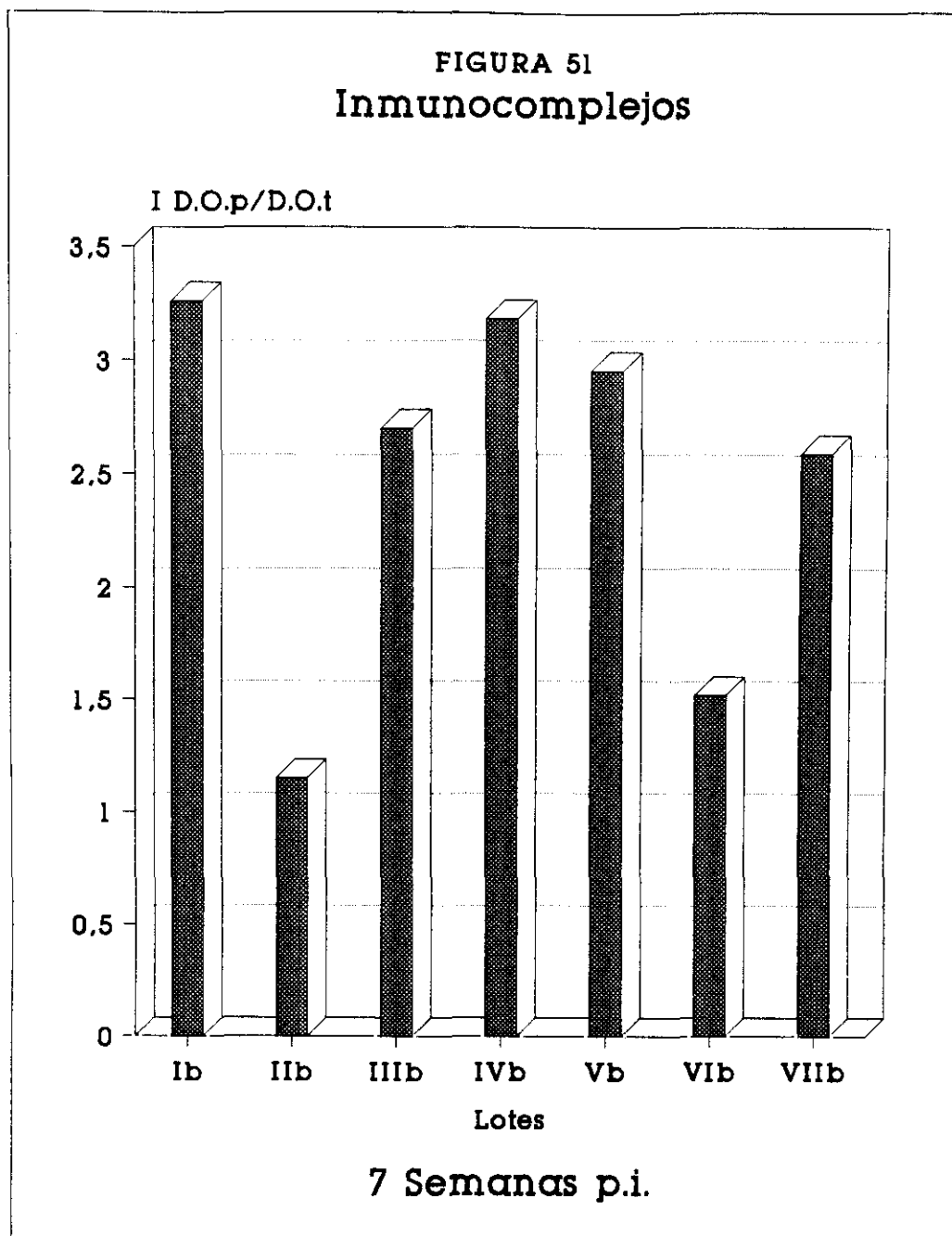
D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/500



4.2.2.2.6.- Representación conjunta



Lote Ib = Control

Lote IIb = Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IIIb = Mebendazol en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

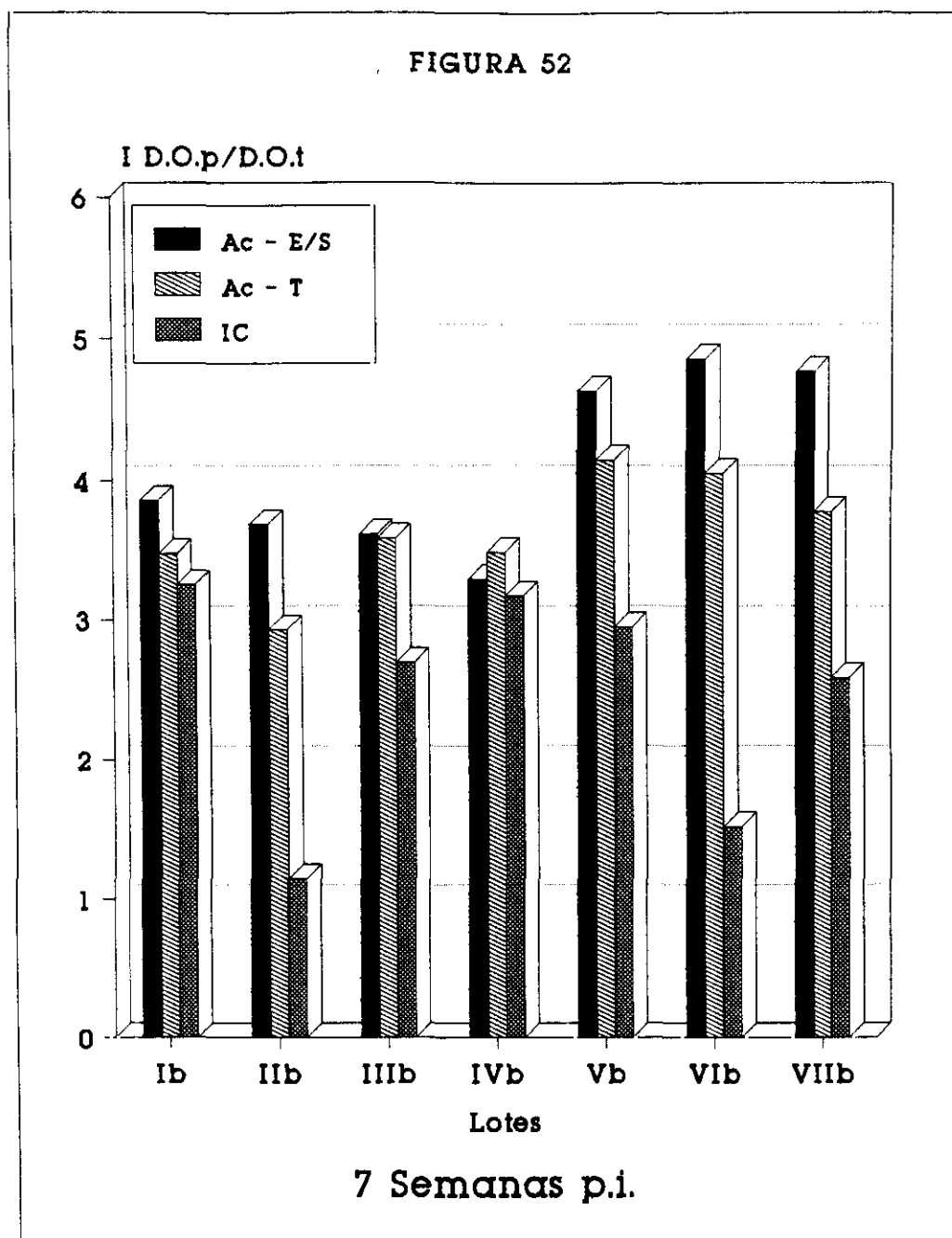
Lote IVb = Mebendazol en agua (100 mg/kg/día)

Lote Vb = Mebendazol en dispersión sólida (100 mg/kg/día)

Lote VIb = Mebendazol en dispersión sólida (50 mg/kg/día)

Lote VIIb = Mebendazol en dispersión sólida (25 mg/kg/día)

4.2.2.3.- REPRESENTACION CONJUNTA DE LA RESPUESTA HUMORAL



Lote Ib = Control

Lote IIb = Mebendazol comercial (Lomper) en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IIIb = Mebendazol en carboximetilcelulosa (100 mg/kg/día)

Lote IVb = Mebendazol en agua (100 mg/kg/día)

Lote Vb = Mebendazol en dispersión sólida (100 mg/kg/día)

Lote VIb = Mebendazol en dispersión sólida (50 mg/kg/día)

Lote VIIb = Mebendazol en dispersión sólida (25 mg/kg/día)

AC - E/S = Anticuerpos frente al antígeno excretor-secretor larvario

AC - T = Anticuerpos frente al antígeno total larvario

IC = Inmunocomplejos

4.3.- PRUEBAS DE PROTECCION CON ANTIGENOS

4.3.1.- RECUPERACION LARVARIA

4.3.1.1.- LOTE A1: CONTROL DE HUEVOS

TABLA XCIII

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	16	9,30	2	1,16	118	68,60	36	20,93	172
R ₂	12	8,63	2	1,43	92	66,18	33	23,74	139
R ₃	12	8,75	3	2,18	82	58,85	40	29,18	137
R ₄	12	7,50	2	1,25	114	71,25	32	20,00	160
R ₅	13	6,87	1	0,52	124	65,60	51	26,98	189
R ₆	15	8,82	2	1,17	106	62,35	47	27,64	170
\bar{x}	13,33	8,31	2	1,28	106	65,63	39,83	24,74	161,16

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

4.3.1.2.- LOTE A2: CONTROL DE ADYUVANTE

TABLA XCIV

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	8	5,22	6	3,92	98	64,05	41	26,79	153
R ₂	6	4,28	3	2,14	96	68,57	35	25,00	140
R ₃	9	5,11	6	3,40	126	71,59	35	19,88	176
R ₄	5	4,09	2	1,63	81	66,39	34	27,86	122
R ₅	6	4,65	1	0,77	80	62,01	42	32,55	129
R ₆	5	2,79	4	2,23	140	78,21	30	16,75	179
\bar{x}	6,5	4,35	3,66	2,34	103,5	68,47	36,16	24,80	149,83

O = Órgano

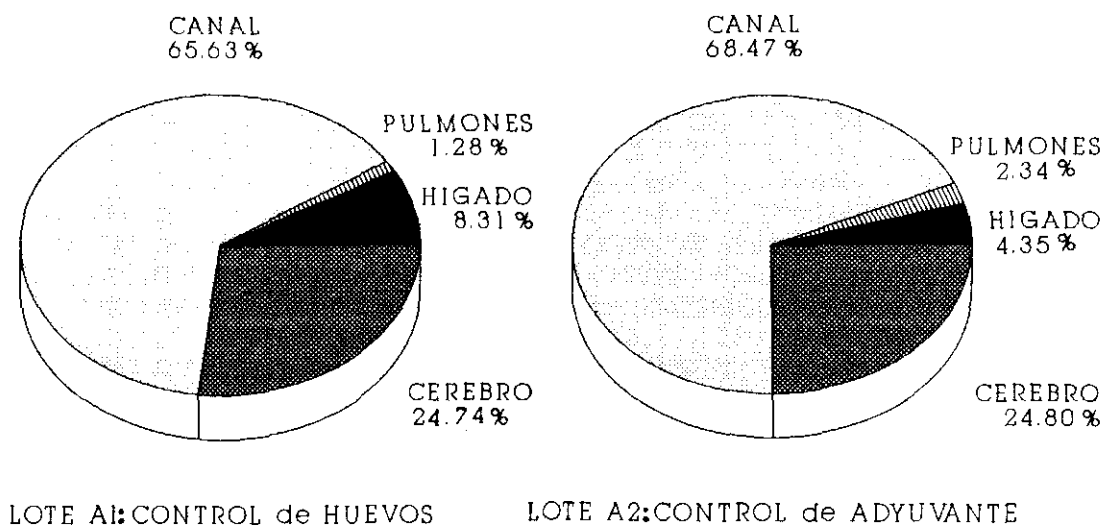
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

FIGURA 53
% Larvas por órgano



Pruebas de protección con antígenos

4.3.1.3.- LOTE A3: INMUNIZACION CON ANTIGENO TOTAL DE ADULTOS

TABLA XCV

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	13	8,55	2	1,31	106	69,73	31	20,39	152
R ₂	10	7,63	1	0,76	84	64,12	36	27,48	131
R ₃	10	7,35	3	2,20	82	60,29	41	30,14	136
R ₄	4	2,87	1	0,71	102	73,38	32	23,02	139
R ₅	17	11,72	0	0	94	64,82	34	23,44	145
R ₆	12	6,66	4	2,22	134	74,44	30	16,66	180
\bar{x}	11	7,46	1,83	1,20	100,33	67,79	34	23,52	147,16

O = Organo

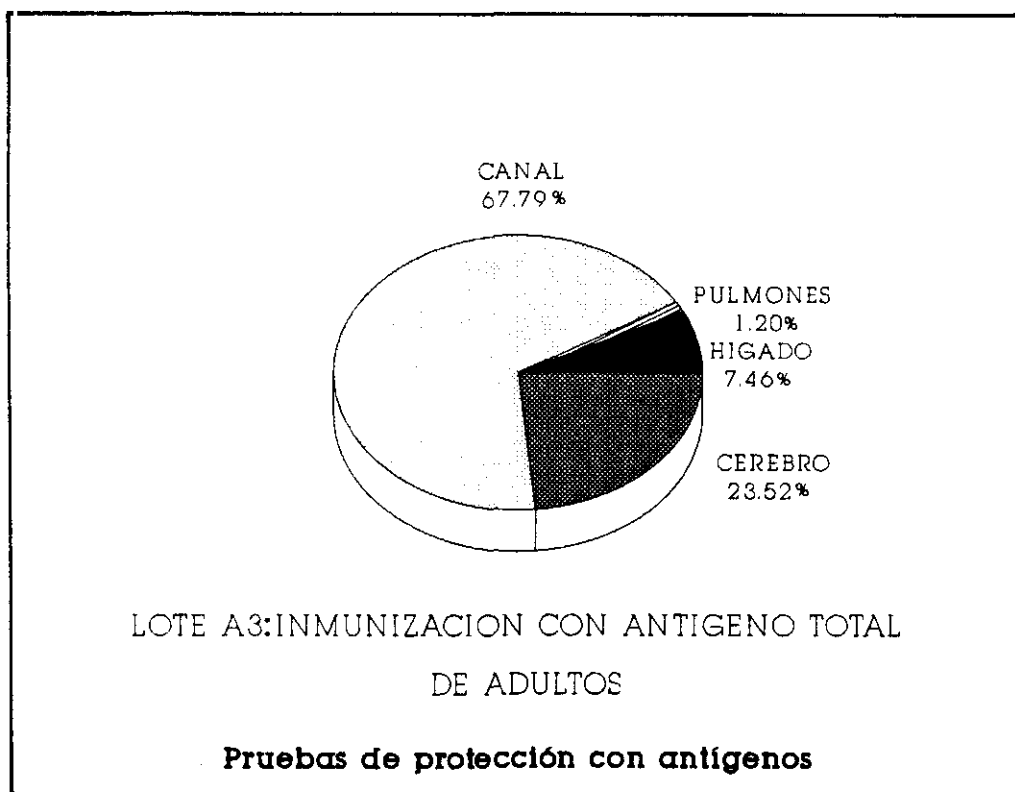
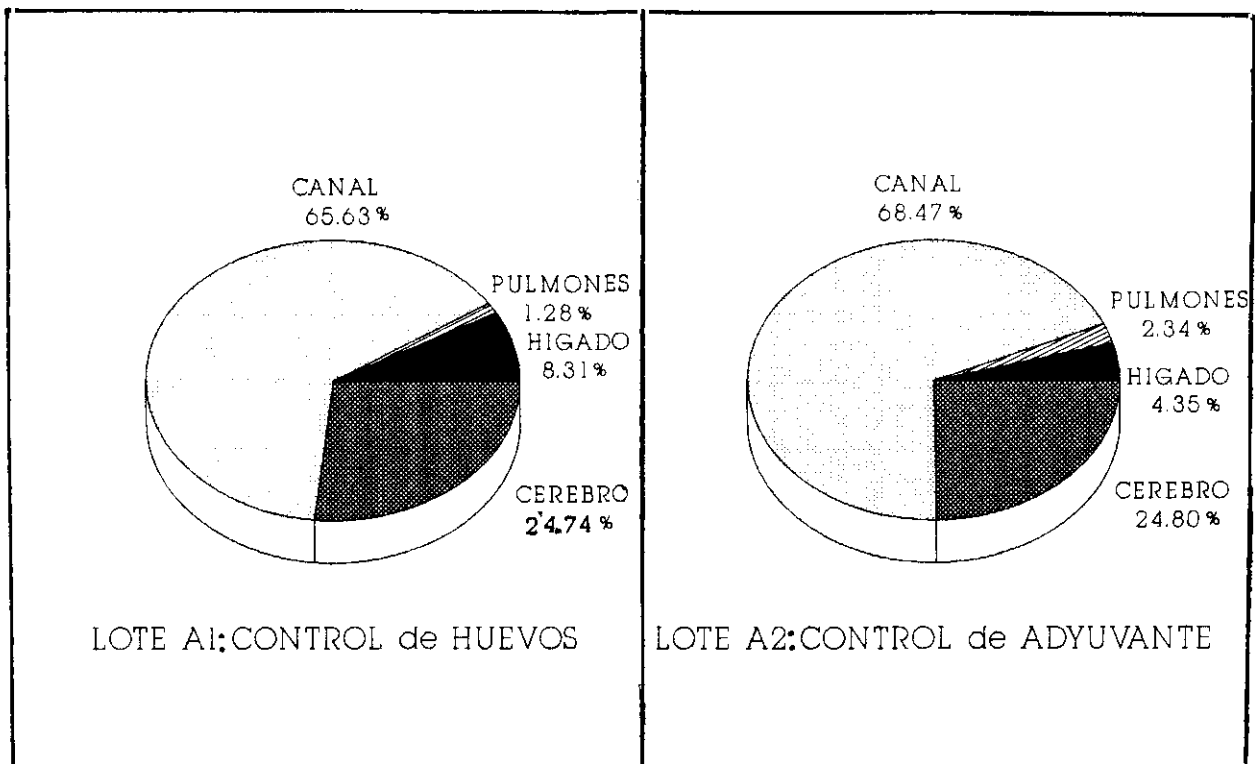
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

\bar{x} = Media aritmética

FIGURA 54
% Larvas por órgano



4.3.1.4.- LOTE A4: INMUNIZACION CON ANTIGENO EXCRETOR-SECRETOR LARVARIO

TABLA XCVI

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	16	11,51	0	0	64	46,04	59	42,44	139
R ₂	5	3,75	1	0,75	76	57,14	51	38,34	133
R ₃	8	4,90	3	1,84	100	61,34	52	31,90	163
R ₄	2	1,25	2	1,25	100	62,69	55	34,59	159
R ₅	12	8,95	2	1,49	78	58,20	42	31,34	134
X	8,60	6,07	1,60	1,06	83,6	57,12	51,80	35,72	145,6

O = Organo

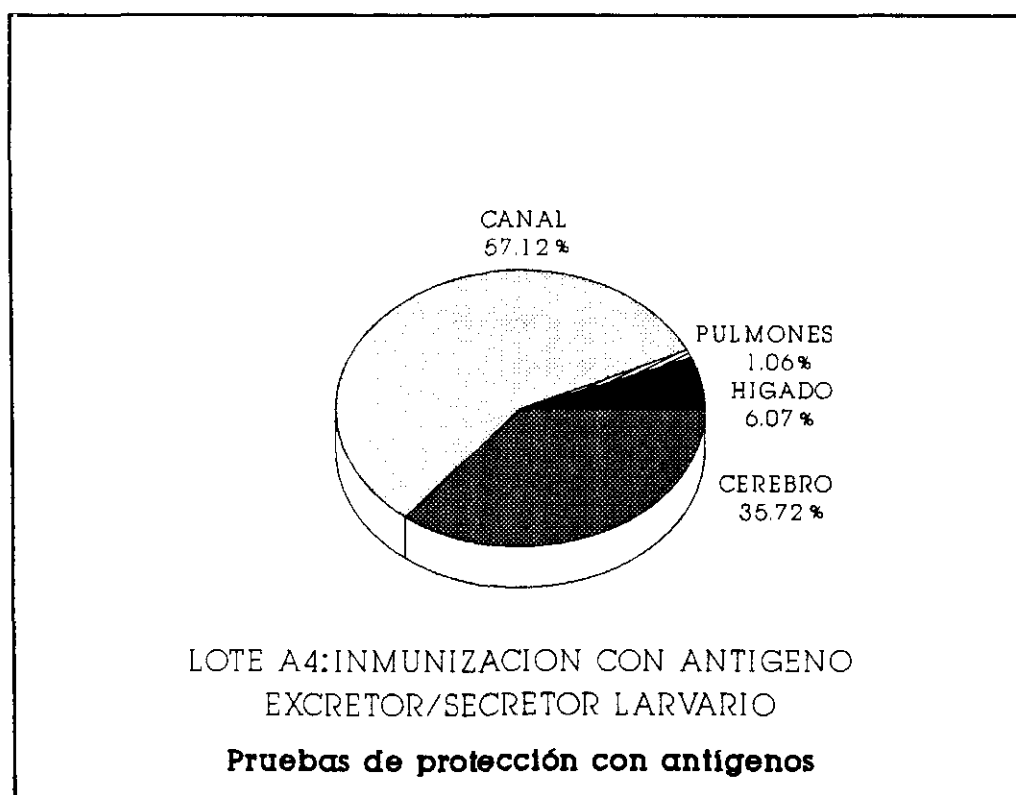
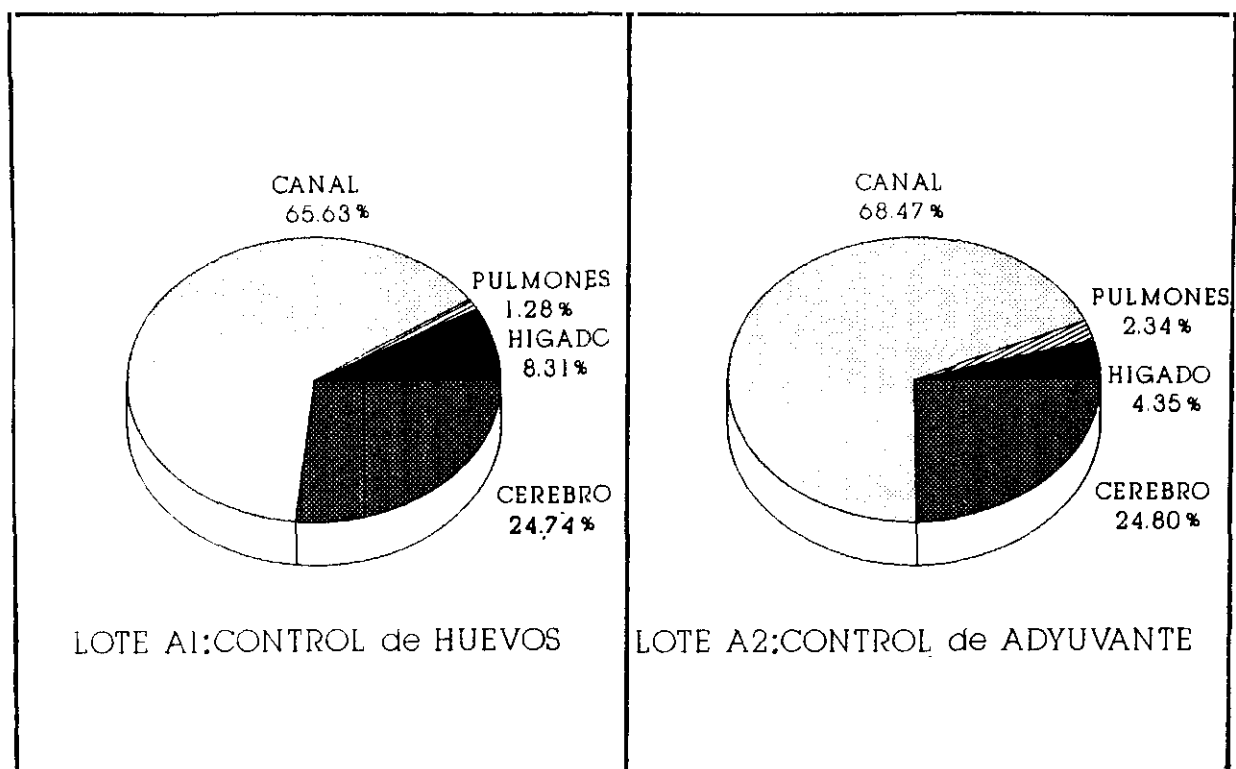
R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

X = Media aritmética

FIGURA 55
% Larvas por órgano



4.3.1.5.- TRATAMIENTO ESTADISTICO

	<u>Lote A1: Control</u>			<u>Lote A2: Control</u>			<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>				
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	8,312	0,924	6	4,357	0,887	4,587	7,567	0,001	SI
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	1,285	0,536	6	2,348	1,152	2,228	2,049	0,05	NO
<u>- CANAL (% L)</u>	6	65,63	4,120	6	68,47	5,835	2,228	0,971	0,05	NO
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	24,747	3,774	6	24,805	5,700	2,228	0,029	0,05	NO
<u>- TOTAL (L)</u>	6	161,167	20,233	6	149,833	23,878	2,228	0,887	0,05	NO

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad

Sig. Significativo

Lote A1: Control
de huevos

Lote A3: Inmuización con
antígeno total de adultos

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	6	8,312	0,924	6	7,463	2,867	2,228	0,690	0,05	NO
- <u>PULMONES (% L)</u>	6	1,285	0,536	6	1,2	0,886	2,228	0,201	0,05	NO
- <u>CANAL (% L)</u>	6	65,63	4,120	6	67,797	5,617	2,228	0,759	0,05	NO
- <u>CEREBRO (% L)</u>	6	24,747	3,774	6	23,521	4,829	2,228	0,490	0,05	NO
- <u>TOTAL (L)</u>	6	161,167	20,233	6	147,167	17,657	2,228	1,277	0,05	NO

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

L Número total de larvas recuperadas

n Número de ratones

\bar{x} Media aritmética de %L ó de L

D.S. Desviación standard

"t" teór. "t" de Student teórica

"t" real "t" de Student real

P Probabilidad ..

Sig. Significativo ..

<u>Lote A1: Control</u>	<u>Lote A4: Inmunización con antígeno</u>
<u>de huevos</u>	<u>excretor-secretor larvario</u>

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
<u>- HIGADO (% L)</u>	6	8,312	0,924	5	6,072	4,119	2,262	1,306	0,05	NO
<u>- PULMONES (% L)</u>	6	1,285	0,536	5	1,066	0,716	2,262	0,581	0,05	NO
<u>- CANAL (% L)</u>	6	65,63	4,120	5	57,122	6,615	2,262	2,617	0,05	SI
<u>- CEREBRO (% L)</u>	6	24,747	3,774	5	35,722	4,666	3,689	4,322	0,005	SI
<u>- TOTAL (L)</u>	6	161,167	20,233	5	145,6	14,311	2,262	1,441	0,05	NO

% L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado
 L Número total de larvas recuperadas
 n Número de ratones
 \bar{x} Media aritmética de %L ó de L
 D.S. Desviación standard
 "t" teór. "t" de Student teórica
 "t" real "t" de Student real
 P Probabilidad
 Sig. Significativo

4.3.1.6.- REPRESENTACION CONJUNTA DE LA CARGA PARASITARIA

TABLA XCVII
CUADRO RESUMEN

$\bar{x} L$ $\bar{x} \% L$	Lote A1	Lote A2	Lote A3	Lote A4
HIGADO	13,33 8,31	6,50 4,35	11,00 7,46	8,60 6,07
PULMONES	2,00 1,28	3,66 2,34	1,83 1,20	1,60 1,06
CANAL	106,00 65,63	103,50 68,47	100,33 67,79	83,60 57,12
CEREBRO	39,83 24,74	36,16 24,80	34,00 23,52	51,80 35,72
TOTAL	161,16	149,83	147,16	145,60

$\bar{x} L$ = Media del número de larvas recuperadas por digestión

$\bar{x} \% L$ = Media del porcentaje de larvas respecto al total recuperado

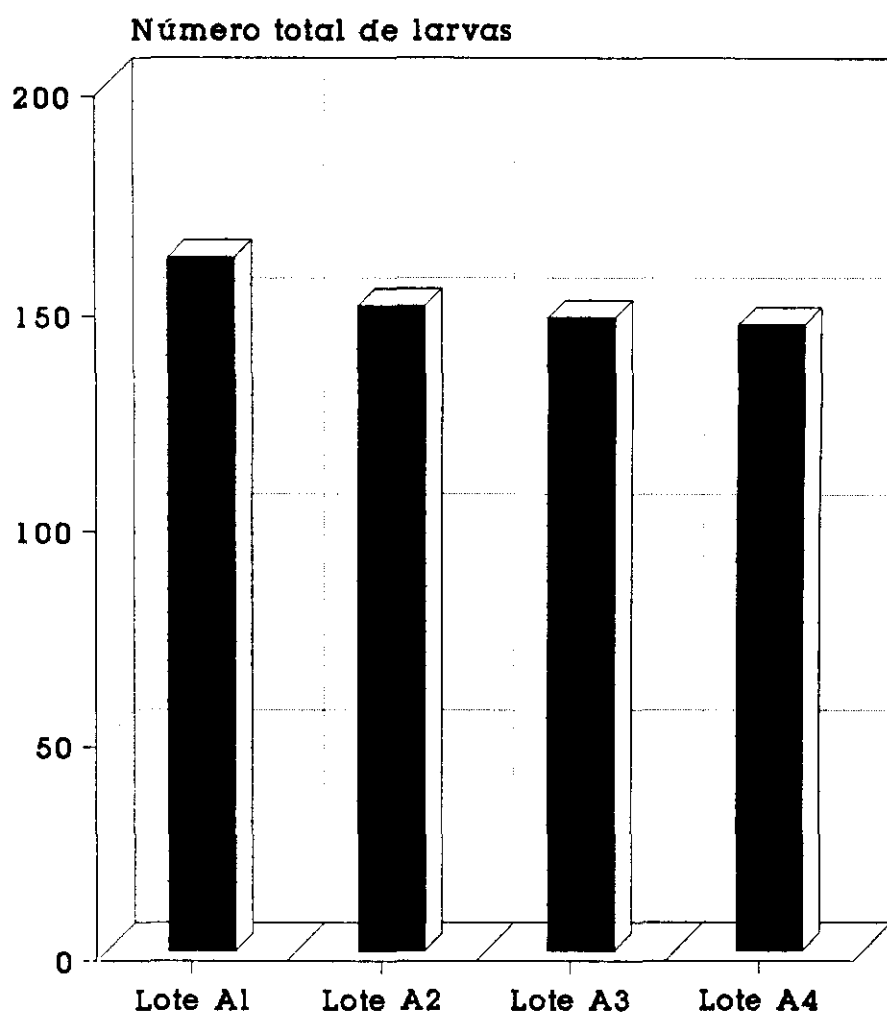
Lote A1 = Control de huevos

Lote A2 = Control de adyuvante

Lote A3 = Inmunización con antígeno total de adultos

Lote A4 = Inmunización con antígeno excretor-secretor larvario

FIGURA 56
CARGA PARASITARIA TOTAL



Pruebas de protección con antígenos

Lote A1 = Control de huevos

Lote A2 = Control de adyuvante

Lote A3 = Inmunización con antígeno total de adultos

Lote A4 = Inmunización con antígeno excretor-secretor larvario

4.3.2.- RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL

4.3.2.1.- FRENTE AL ANTÍGENO TOTAL DE ADULTOS

4.3.2.1.1.- Lote A1: Control de huevos

TABLA XCVIII

Sem p.i.	0	6	7	8
D.O.	0,217	0,343	0,423	0,407
AgT _A	0,139	0,261	0,367	0,342
D.O.	0,031	0,054	0,055	0,028
B.S.A.	0,024	0,039	0,053	0,031
D.O.	0,151	0,256	0,341	0,345
\bar{X} -B.S.A.				
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	1,69	2,25	2,28

Sem p.i. = Semanas postinoculación (tiempos referidos a experiencia completa)

D.O. AgT_A = Densidad óptica frente al antígeno total de adultos

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I.D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/2.000

Semana 5 p.i. = Inoculación de huevos embrionados

4.3.2.1.2.- Lote A2: Control de adyuvante

TABLA XCIX

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
D.O.	0,217	0,194	0,247	0,394	0,155	0,456	0,715	0,718	0,640
AgT _A	0,139	0,195	0,206	0,369	0,171	0,518	0,664	0,709	0,671
D.O.	0,031	0,029	0,028	0,031	0,103	0,037	0,048	0,048	0,047
B.S.A.	0,024	0,040	0,023	0,022	0,123	0,032	0,049	0,047	0,058
D.O.	0,151	0,160	0,201	0,355	0,050	0,453	0,641	0,666	0,603
X-B.S.A.									
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	1,05	1,33	2,35	0,33	3,00	4,24	4,41	3,99

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. AgT_A = Densidad óptica frente al antígeno total de adultos

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/2.000

4.3.2.1.3.- Lote A3: Inmunización con antígeno total de adultos

TABLA C

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
D.O.	0,217	0,362	0,697	0,906	1,137	1,259	1,321	1,364	1,349
AgT _A	0,139	0,432	0,813	1,057	1,103	1,237	1,371	1,396	1,407
D.O.	0,031	0,012	0,025	0,031	0,019	0,026	0,022	0,020	0,020
B.S.A.	0,024	0,017	0,032	0,012	0,026	0,035	0,058	0,053	0,057
D.O.	0,151	0,383	0,727	0,960	1,098	1,218	1,306	1,344	1,340
\bar{X} -B.S.A.									
I D.O.p D.O.t	-----	2,53	4,81	6,35	7,27	8,06	8,64	8,90	8,87

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. AgT_A = Densidad óptica frente al antígeno total de adultos

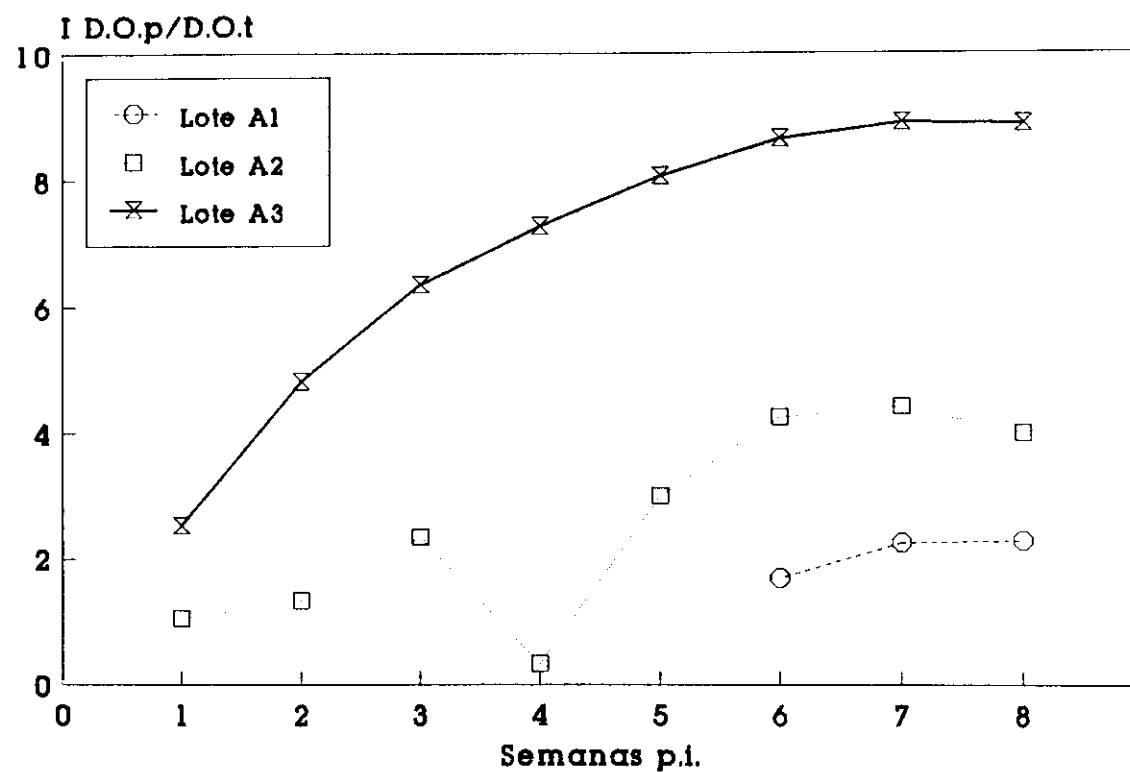
D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo.

Dilución del conjugado = 1/2.000

FIGURA 57
Anticuerpos frente Ag total de adultos



Lote A1 = Control de huevos

Lote A2 = Control de adyuvante

Lote A3 = Inmunización con antígeno total de adultos

4.3.2.2.- FRENTE AL ANTIGENO EXCRETOR-SECRETOR LARVARIO

4.3.2.2.1.- Lote A1: Control de huevos

TABLA CI

Sem p.i.	0	6	7	8
D.O.	0,257	0,443	0,836	0,900
Ag E/S	0,272	0,507	0,787	0,827
D.O.	0,132	0,214	0,240	0,132
B.S.A.	0,089	0,100	0,138	0,086
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,154	0,318	0,622	0,754
$I \frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	2,06	4,03	4,89

Sem p.i. = Semanas postinoculación (tiempos referidos a experiencia completa)

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

$I \frac{D.O.p}{D.O.t}$ = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/250

Semana 5 p.i. = Inoculación de huevos embrionados

4.3.2.2.2.- Lote A2: Control de adyuvante

TABLA CII

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
D.O.	0,257	0,305	0,263	0,339	0,482	0,309	0,579	0,829	0,954
Ag E/S	0,272	0,320	0,343	0,362	0,560	0,321	0,611	0,878	1,033
D.O.	0,132	0,152	0,119	0,136	0,185	0,141	0,135	0,160	0,156
B.S.A.	0,089	0,114	0,095	0,117	0,160	0,111	0,140	0,164	0,174
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,154	0,179	0,196	0,224	0,349	0,189	0,458	0,691	0,828
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	1,16	1,27	1,45	2,26	1,22	2,97	4,48	5,37

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} - B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/250

4.3.2.2.3.- Lote A4: Inmunización con antígeno excretor-secretor larvario

TABLA CIII

Sem p.i.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
D.O.	0,234	0,320	0,220	0,597	0,469	0,812	1,151	1,152	1,141
Ag E/S	0,287	0,327	0,331	0,644	0,491	0,792	1,067	1,031	1,061
D.O.	0,120	0,219	0,194	0,247	0,242	0,303	0,290	0,190	0,187
B.S.A.	0,102	0,164	0,171	0,231	0,253	0,263	0,198	0,209	0,206
D.O.	0,149	0,132	0,093	0,381	0,233	0,519	0,865	0,892	0,905
X-B.S.A.									
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	0,88	0,62	2,55	1,56	3,48	5,80	5,98	6,07

Sem p.i. = Semanas postinoculación

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

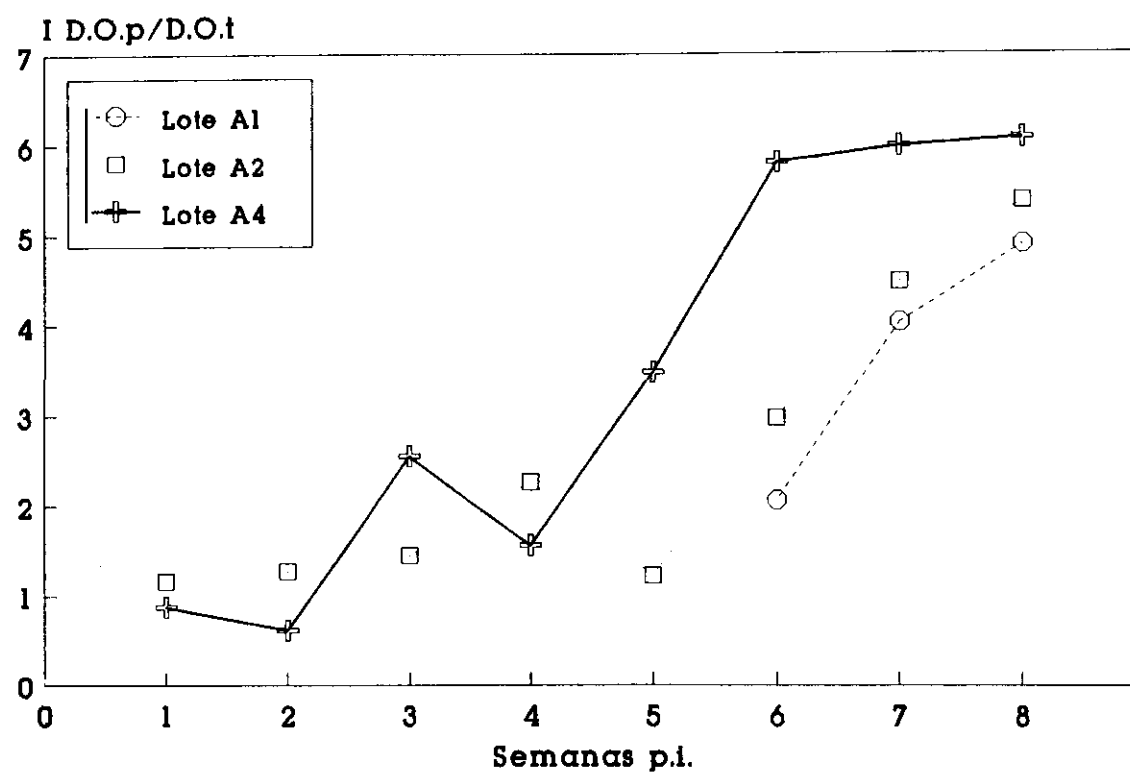
D.O. B.S.A. = Densidad optica frente a la B.S.A.

D.O. X-B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente
a la B.S.A.

I D.O.p/D.O. t = D.O. problema/D.O. testigo

Dilución del conjugado = 1/250

FIGURA 58
Anticuerpos frente al Ag E/S larvario



Lote A1 = Control de huevos

Lote A2 = Control de adyuvante

Lote A4 = Inmunización con antígeno excretor-secretor larvario

4.4.- PROTECCION CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1

4.4.1.- VIDA MEDIA DEL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1 "IN VIVO"

TABLA CIV

Conejo I

D. p.i.	1	3	5	7	9	11	13	C-	C+
D.O.	1,376	1,007	0,925	0,748	0,483	0,353	0,270	0,249	2,000
anti-IgR	1,385	0,982	0,836	0,632	0,400	0,227	0,207	0,202	1,934
D.O.	0,108	0,115	0,124	0,135	0,140	0,145	0,151	0,110	0,117
B.S.A.	0,130	0,137	0,146	0,129	0,131	0,131	0,132	0,132	0,131
D.O.	1,261	0,868	0,745	0,558	0,306	0,152	0,097	0,104	1,843
\bar{X} -B.S.A.									

TABLA CV

Conejo II

D. p.i.	2	4	6	8	10	12	20	C-	C+
D.O.	1,582	1,190	0,864	0,480	0,399	0,371	0,314	0,249	2,000
anti-IgR	1,533	1,125	0,715	0,422	0,372	0,287	0,174	0,202	1,934
D.O.	0,113	0,120	0,151	0,139	0,142	0,150	0,170	0,110	0,117
B.S.A.	0,134	0,140	0,120	0,127	0,130	0,138	0,135	0,132	0,131
D.O.	1,434	1,027	0,654	0,318	0,249	0,185	0,092	0,104	1,843
\bar{X} -B.S.A.									

D. p.i. = Días postinoculación

C- = Suero de conejo control negativo

C+ = Anticuerpo monoclonal TC-1 a 2,5 ug/ml

D.O. anti-IgR = Densidad óptica frente a anti-inmunoglobulinas de ratón

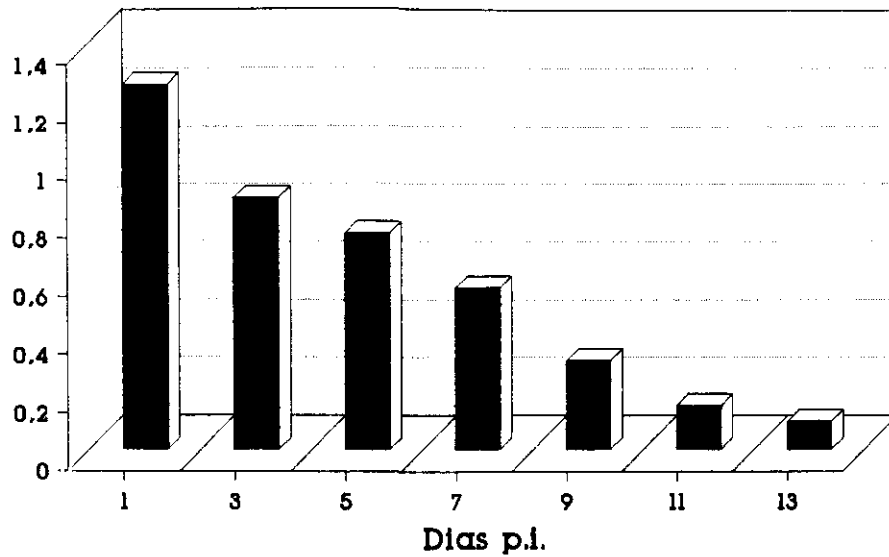
D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

Dilución del conjugado = 1/2.000

FIGURA 59
Conejo I

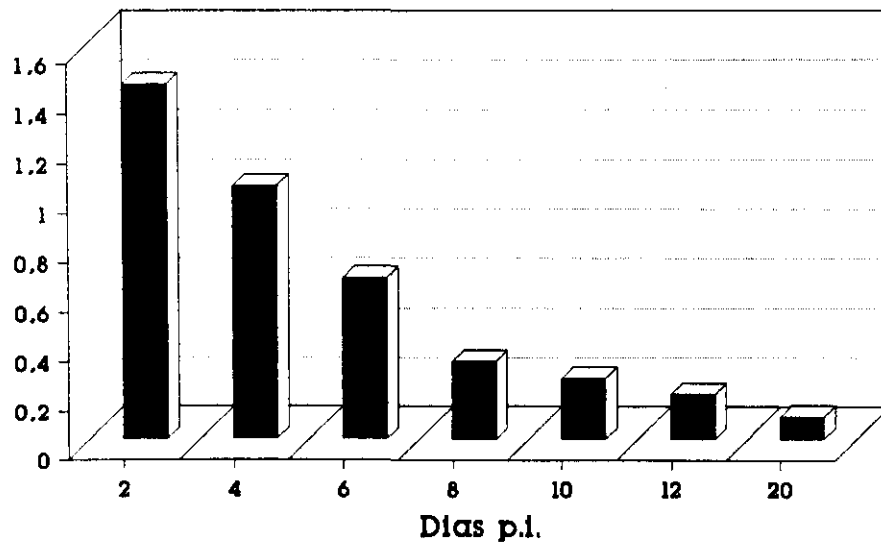
D.O. 492



Vida media de TC-1 "in vivo"

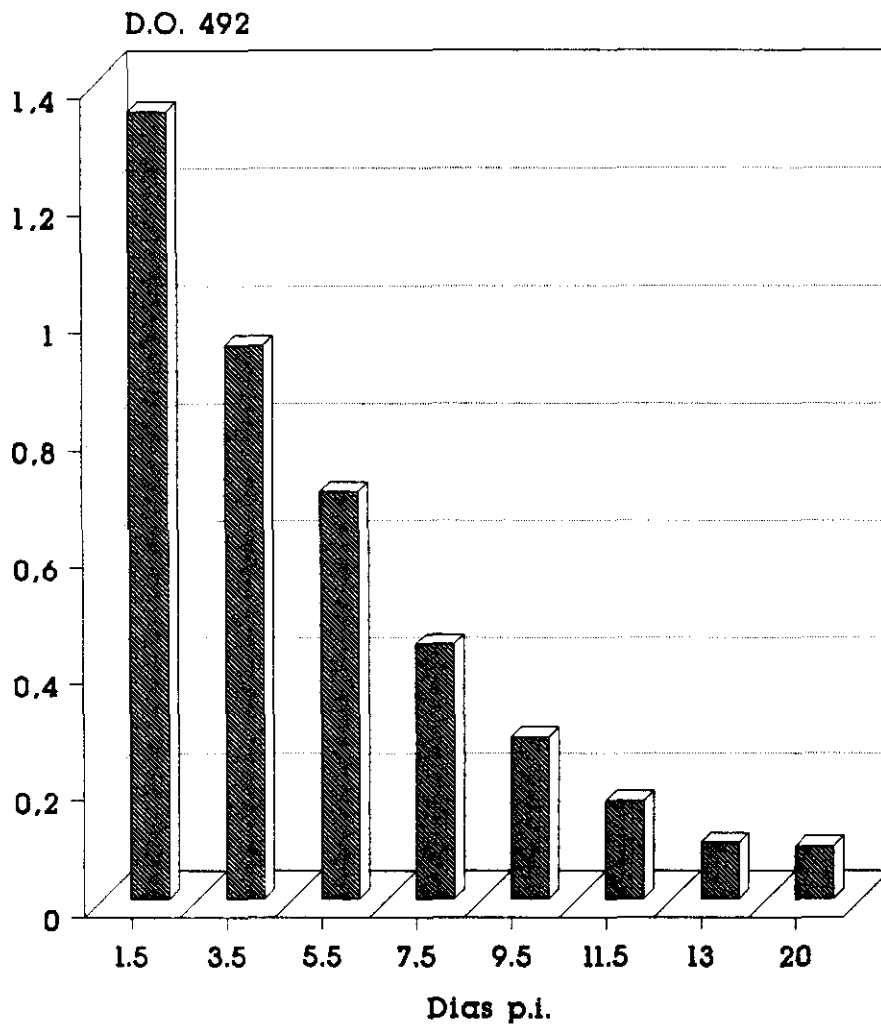
FIGURA 60
Conejo II

D.O. 492



Vida media de TC-1 "in vivo"

FIGURA 61
Valores medios: Conejos I y II



Vida media TC-1 "in vivo"

4.4.2.- PRUEBAS DE PROTECCION PASIVA

4.4.2.1.- LOTE B1: CONTROL

TABLA CVI

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	79	52,31	3	1,98	48	31,78	21	13,90	151
R ₂	83	50,92	3	1,84	52	31,90	25	15,33	163
R ₃	81	50,31	5	3,10	52	32,29	23	14,28	161
R ₄	80	51,28	3	1,92	50	32,05	23	14,74	156
R ₅	79	50	3	1,89	54	34,17	22	13,92	158
\bar{X}	80,4	50,96	3,4	2,14	51,2	32,43	22,8	14,43	157,8

O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

4.4.2.2.- LOTE B2: INOCULACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL EL DIA -1

TABLA CVII

R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	38	48,10	0	0	34	43,03	7	8,86	79
R ₂	35	46,05	2	2,63	32	42,10	7	9,21	76
R ₃	35	44,87	1	1,28	32	41,02	10	12,82	78
R ₄	38	48,75	3	3,75	28	35	10	12,5	80
R ₅	37	50	0	0	32	43,24	5	6,75	74
\bar{X}	36,8	47,55	1,2	1,53	31,6	40,87	7,8	10,02	77,4

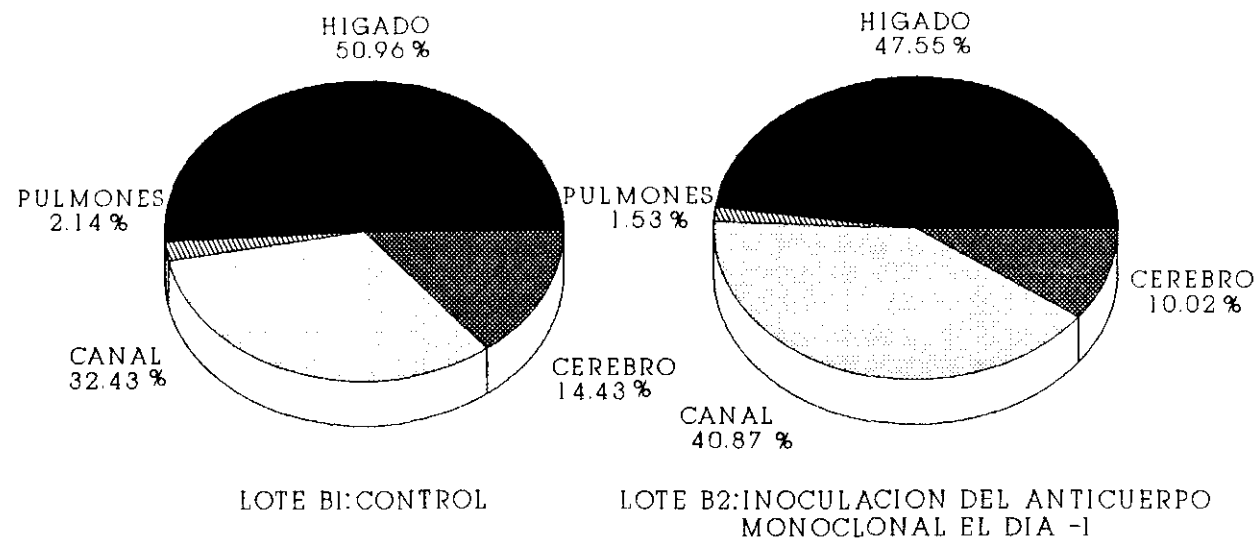
O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

FIGURA 62
% Larvas por órgano



Pruebas de protección pasiva con TC-1

4.4.2.3.- LOTE B3: INOCULACION SIMULTANEA DE ANTICUERPO MONOCLONAL Y HUEVOS

TABLA CVIII

O R	HIGADO		PULMONES		CANAL		CEREBRO		TOTAL
	L	% L	L	% L	L	% L	L	% L	L
R ₁	113	71,51	3	1,89	30	18,98	12	7,59	158
R ₂	107	68,58	2	1,28	32	20,51	15	9,61	156
R ₃	117	72,67	2	1,24	28	17,39	14	8,69	161
R ₄	112	74,17	2	1,32	28	18,54	9	5,96	151
R ₅	116	74,35	2	1,28	28	17,94	10	6,41	156
\bar{X}	113	72,25	2,2	1,4	29,2	18,67	12	7,65	156,4

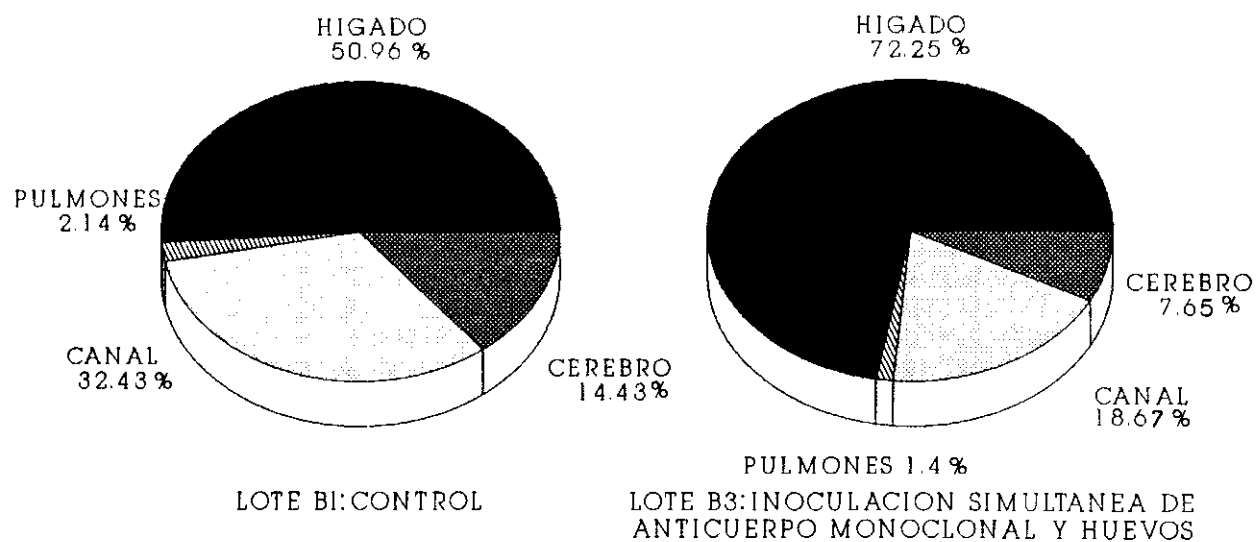
O = Organo

R = Ratón

L = Número de larvas recuperadas por digestión

% L = Porcentaje de larvas respecto al total recuperado

FIGURA 63
% Larvas por órgano



Pruebas de protección pasiva con TC-1

4.4.2.4.- TRATAMIENTO ESTADISTICO

<u>Lote B1: Control</u>				<u>Lote B2: Inoculacion del</u>						
				<u>AcMn el día -1</u>						
	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	5	50,964	0,904	5	47,554	2,072	3,355	3,372	0,01	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	5	2,146	0,536	5	1,532	1,649	2,306	0,792	0,05	NO
- <u>CANAL (% L)</u>	5	32,438	0,987	5	40,878	3,401	5,041	5,329	0,001	SI
- <u>CEREBRO (% L)</u>	5	14,434	0,601	5	10,028	2,583	3,355	3,714	0,01	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	5	157,8	4,685	5	77,4	2,408	5,041	34,283	0,001	SI

AcMn Anticuerpo monoclonal
 % L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado
 L Número total de larvas recuperadas
 n Número de ratones
 \bar{x} Media aritmética de %L ó de L
 D.S. Desviación standard
 "t" teór. "t" de Student teórica
 "t" real "t" de Student real
 P Probabilidad
 Sig. Significativo

Lote B1: Control Lote B3: Inoculación simultánea
de AcMn y huevos

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S.</u>	<u>"t" teór.</u>	<u>"t" real</u>	<u>P <</u>	<u>Sig.</u>
- <u>HIGADO (% L)</u>	5	50,964	0,904	5	72,256	2,361	5,041	18,834	0,001	SI
- <u>PULMONES (% L)</u>	5	2,146	0,536	5	1,402	0,274	2,306	2,764	0,05	SI
- <u>CANAL (% L)</u>	5	32,438	0,987	5	18,672	1,190	5,041	19,906	0,001	SI
- <u>CEREBRO (% L)</u>	5	14,434	0,606	5	7,652	1,526	5,041	9,233	0,001	SI
- <u>TOTAL (L)</u>	5	157,8	4,685	5	156,4	3,647	2,306	0,529	0,05	NO

AcMn Anticuerpo monoclonal
 % L Porcentaje de larvas respecto al total recuperado
 L Número total de larvas recuperadas
 n Número de ratones
 \bar{x} Media aritmética de %L ó de L
 D.S. Desviación standard
 "t" teór. "t" de Student teórica
 "t" real "t" de Student real
 P Probabilidad
 Sig. Significativo

4.4.2.5.- REPRESENTACION CONJUNTA DE LA CARGA PARASITARIA

TABLA CIX
CUADRO RESUMEN

$\begin{matrix} \diagup & x & L \\ \diagdown & x & \% L \end{matrix}$	Lote B1	Lote B2	Lote B3
HIGADO	80,40 50,96	36,80 47,55	113 72,25
PULMONES	3,40 2,14	1,20 1,53	2,20 1,40
CANAL	51,20 32,43	31,60 40,87	29,20 18,67
CEREBRO	22,80 14,43	7,80 10,02	12,00 7,65
TOTAL	157,80	77,40	156,40

X L = Media del número de larvas recuperadas por digestión

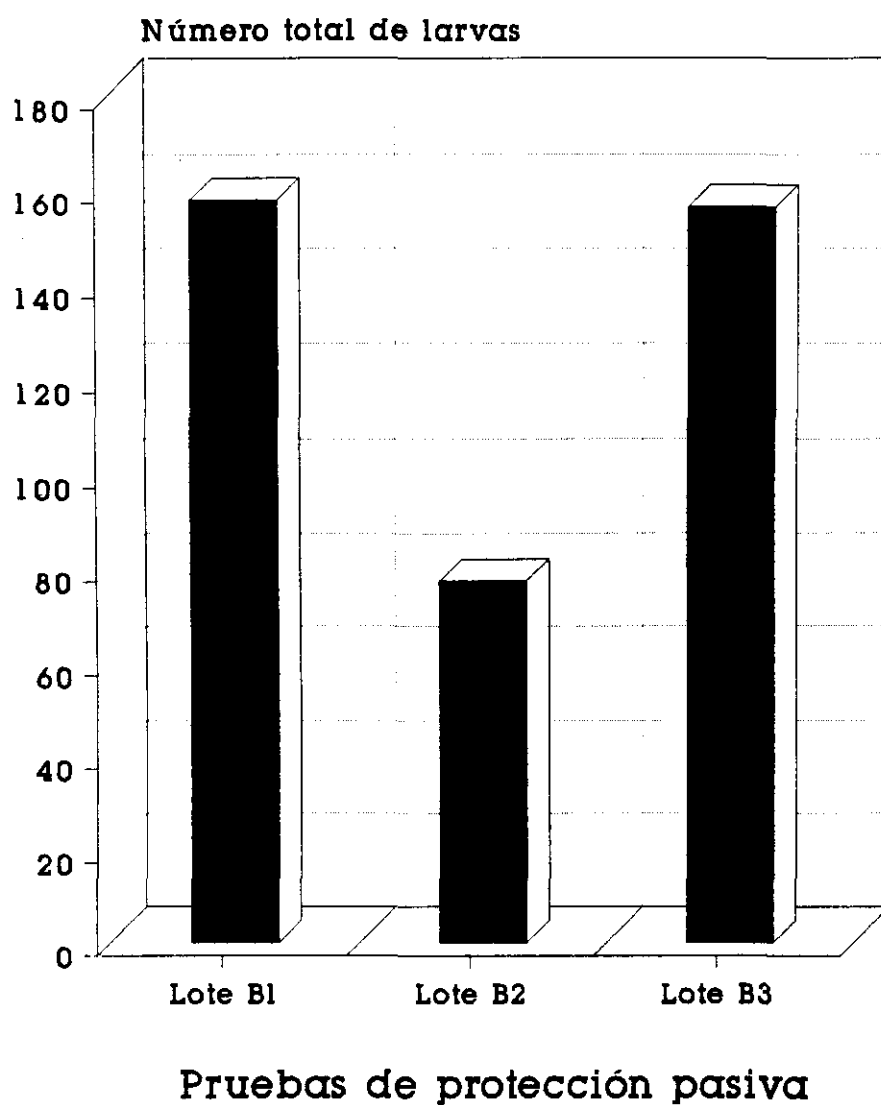
X % L = Media del porcentaje de larvas respecto al total recuperado

Lote B1 = Control

Lote B2 = Inoculación del anticuerpo monoclonal el día -1

Lote B3 = Inoculación simultánea de anticuerpo monoclonal y huevos

FIGURA 64
CARGA PARASITARIA TOTAL



Lote B1 = Control

Lote B2 = Inoculación del anticuerpo monoclonal el día -1

Lote B3 = Inoculación simultánea del anticuerpo monoclonal y huevos

4.5.- OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO FRENTE AL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1

4.5.1.- OBTENCION Y CARACTERIZACION DE FRAGMENTOS $F(ab')_2$ DEL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1

4.5.1.1.- DIGESTION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1

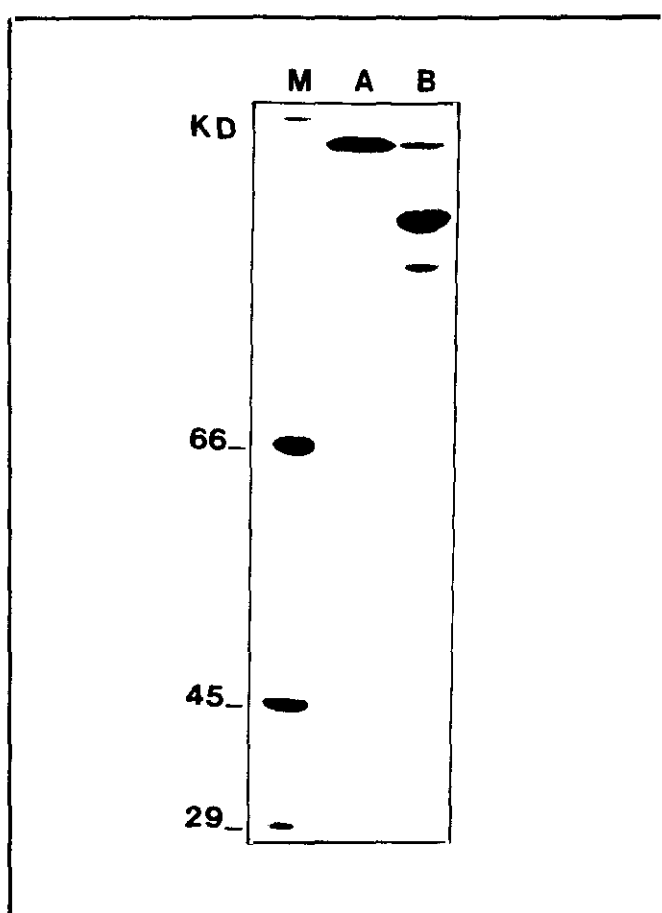


FOTO 7

Análisis en SDS-PAGE del 10% (Condiciones no reductoras)

M = Marcadores de peso molecular

A = 40 ug de anticuerpo monoclonal TC-1 sin digerir (t = 0)

B = 40 ug de anticuerpo monoclonal TC-1 digerido (t = final)

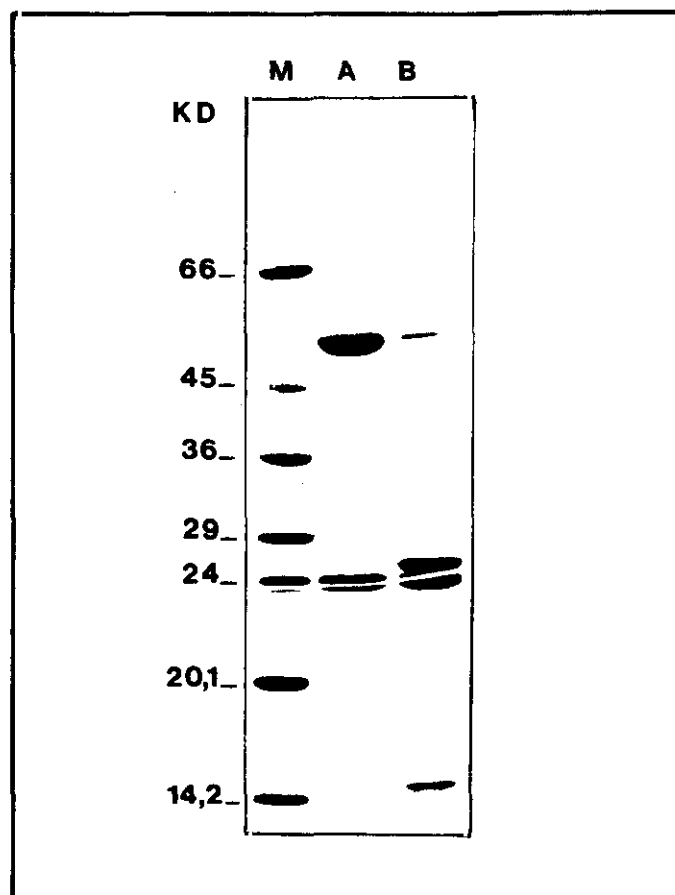


FOTO 8

Análisis en SDS-PAGE del 12,5% (Condiciones reductoras)

M = Marcadores de peso molecular

A = 40 ug de anticuerpo monoclonal TC-1 sin digerir (t = 0)

B = 40 ug de anticuerpo monoclonal TC-1 digerido (t = final)

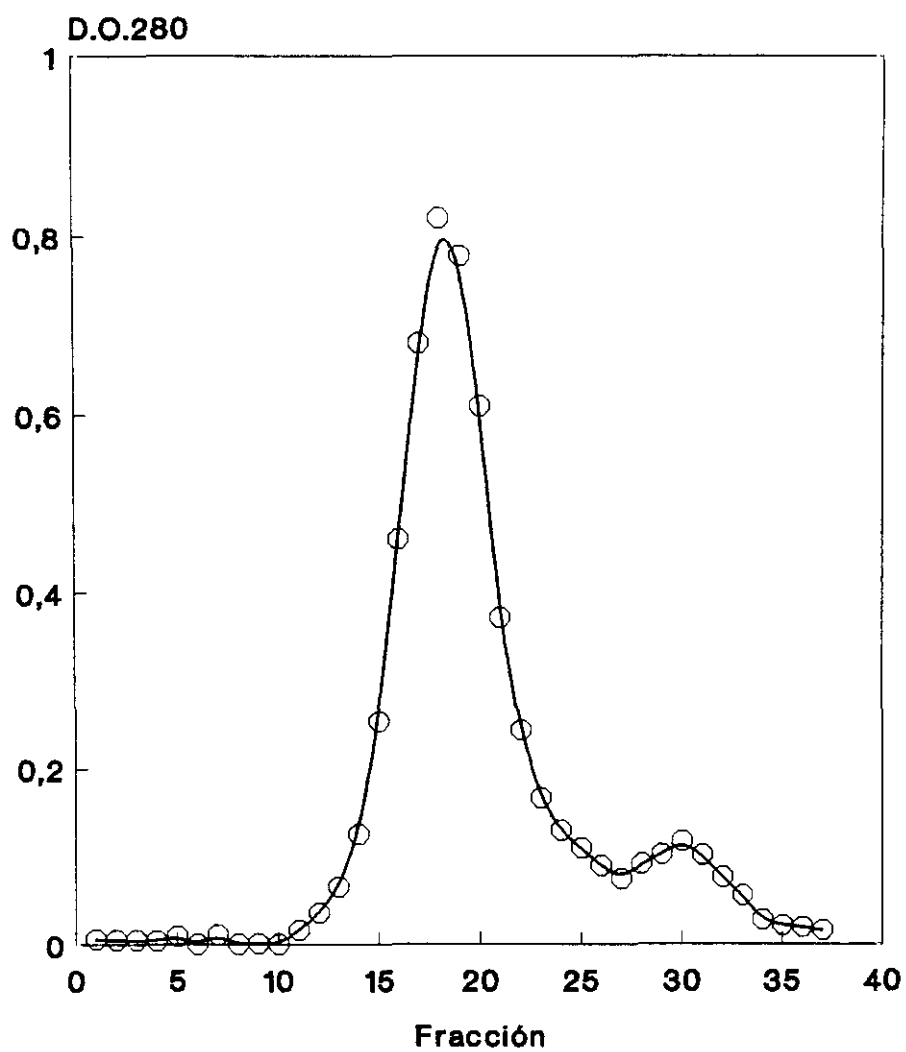
4.5.1.2.- ELIMINACION DE LAS FRACCIONES DE BAJO PESO MOLECULAR

a) Filtración por columna de ultragel ACA-44

<u>Tubo</u>	<u>D.O.</u>	<u>Tubo</u>	<u>D.O.</u>
1	0,006	23	0,167
2	0,005	24	0,130
3	0,005	25	0,110
4	0,004	26	0,090
5	0,010	27	0,075
6	0,000	28	0,092
7	0,011	29	0,103
8	0,000	30	0,118
9	0,001	31	0,101
10	0,000	32	0,077
11	0,016	33	0,056
12	0,036	34	0,028
13	0,066	35	0,022
14	0,126	36	0,020
15	0,253	37	0,016
T ₁₆ --->	16	0,459	
P ---> [17	0,679	
	18	0,820	
	19	0,778	
	20	0,609	
	21	0,371	
	22	0,243	

<u>Fracción</u>	<u>D.O.280</u>	<u>Volumen</u>	<u>Concentración</u>
T ₁₆	0,459	2 ml	332,60 ug/ml
P	0,646	10 ml	468,11 ug/ml

FIGURA 65
Columna ACA-44



b) Caracterización de las fracciones purificadas

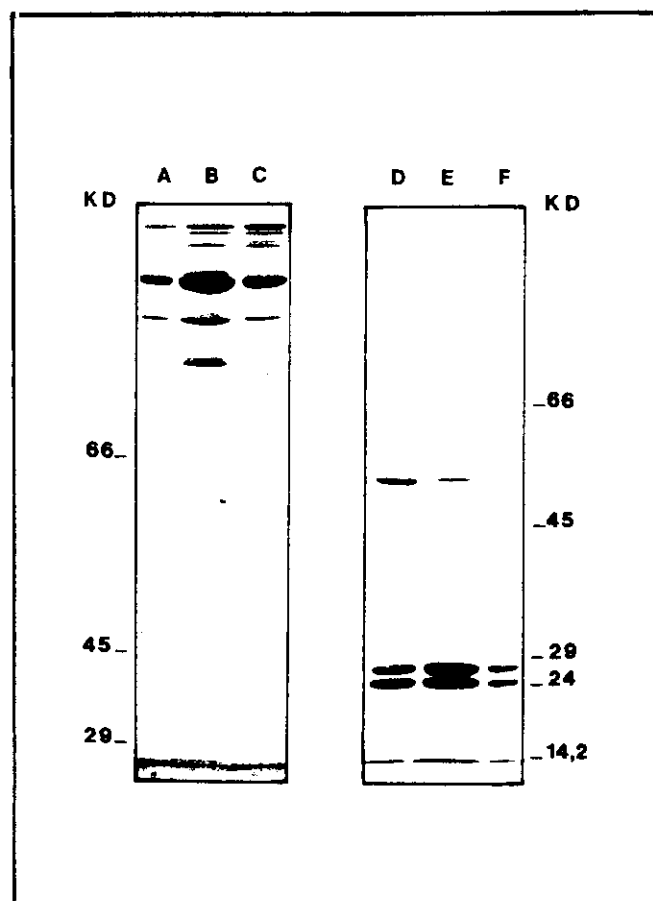


FOTO 9

Análisis en SDS-PAGE del 10%

Condiciones no reductoras:

A = 10 ug de la fracción P

B = 40 ug de la fracción P

C = 20 ug de la fracción T₁₆

Condiciones reductoras:

D = 20 ug de la fracción T₁₆

E = 40 ug de la fracción P

F = 10 ug de la fracción P

4.5.1.3.- DIGESTION DE LAS FRACCIONES SELECCIONADAS

a) Concentración mediante sistema Amicon Centriprep 30

M = Mezcla de las fracciones T₁₆ y P, concentrada

D.O. 280 M (dilución 1/20) = 0,117; Concentración M = 1,695 mg/ml

Proteína total = 1,695 mg/ml x 2,5 ml = 4,23 mg

b) Digestión

M' = Mezcla de las fracciones T₁₆ y P, concentrada y digerida

D.O. 280 M' (dilución 1/20) = 0,031; Concentración M' = 449,2 ug/ml

Proteína total = 449,2 ug/ml x 4,35 ml = 1,954 mg

c) Electroforesis

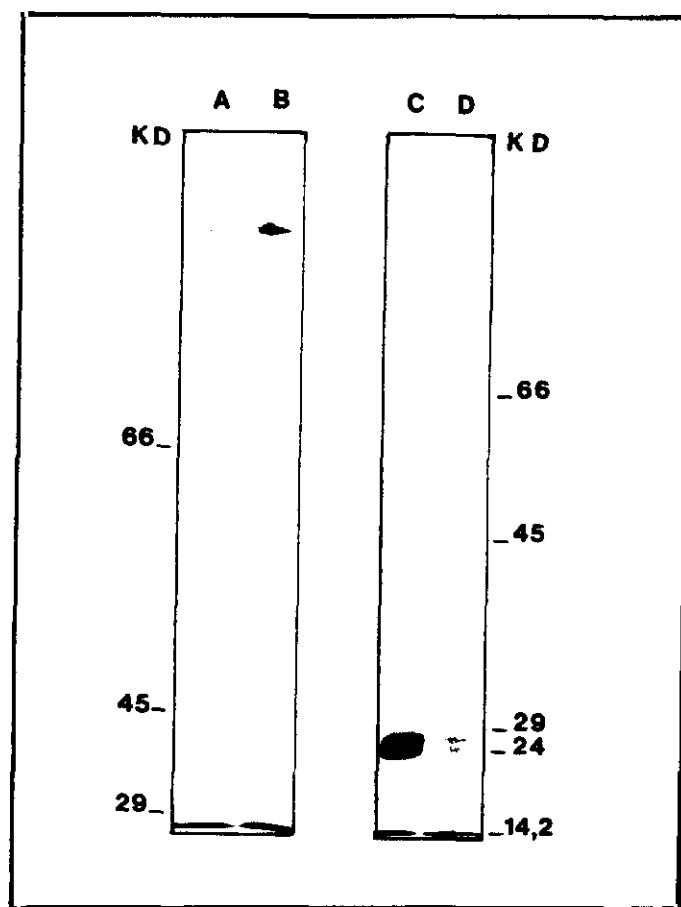


FOTO 10

Análisis en SDS-PAGE de la mezcla de las fracciones T₁₆ y P concentrada y digerida.

Condiciones no reductoras: A = 10 ug de muestra, B = 40 ug de muestra

Condiciones reductoras: C = 40 ug de muestra, D = 10 ug de muestra

4.5.2.- PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD MEDIANTE IMMUNOGLOBULINAS DE RATON ACOPLADAS A COLUMNA DE SEPHAROSA 4B ACTIVADA CON BROMURO DE CIANOGENO

4.5.2.1.- PRIMERA PURIFICACION

4.5.2.1.1.- Muestra preliminar de suero

CONEJO 1

a) Filtración

	<u>Tubo</u>	<u>D.O.</u>
P →	1	0,960
	2	0,966
	3	0,966
	4	0,968
	5	0,964
	6	0,713
	7	0,139
	8	0,029
	9	0,006
	10	0,000

Volumen procesado = 1 ml de suero

P = Fracciones correspondientes a la muestra parcialmente purificada una vez

D.O.280 P (dilución 1/10) = 0,400

Concentración P (dilución 1/10) = 289,85 ug/ml

Concentración P = 2,89 mg/ml

Volumen recogido = 13 ml

Proteína total = 2,89 mg/ml x 13 ml = 37,57 mg

Dilución de la muestra parcialmente purificada una vez = 1:13

b) Elución

	<u>Tubo</u>	<u>D.O.</u>
	1	0,058
	2	0,017
	3	0,036
P' --> [4	0,440
	5	0,229
	6	0,062
	7	0,031

P' = Fracciones correspondientes a inmunoglobulinas de
conejo anti-inmunoglobulinas de ratón

D.O.280 P' = 0,371

Concentración P' = 268,84 ug/ml

Volumen recogido = 8 ml

Proteína total = 268,84 ug/ml x 8 ml = 2,15 mg

CONEJO 2

a) Filtración

	<u>Tubo</u>	<u>D.O.</u>
P →	1	0,965
	2	0,987
	3	0,980
	4	0,980
	5	0,768
	6	0,152
	7	0,057
	8	0,015
	9	0,010
	10	0,007

Volumen procesado = 1 ml de suero

P = Fracciones correspondientes a la muestra parcialmente
purificada una vez

D.O.280 P (dilución 1/10) = 0,278

Concentración P (dilución 1/10) = 201,44 ug/ml

Concentración P = 2,01 mg/ml

Volumen recogido = 17 ml

Proteína total = 2,01 mg/ml x 17 ml = 34,17 mg

Dilución de la muestra parcialmente purificada una vez = 1:17

b) Elución

	<u>Tubo</u>	<u>D.O.</u>
	1	0,029
	2	0,045
	3	0,020
P' →	4	0,457
	5	0,466
	6	0,095
	7	0,010
	8	0,010
	9	0,034

P' = Fracciones correspondientes a inmunoglobulinas de
conejo anti-inmunoglobulinas de ratón

D.O.280 P' = 0,420

Concentración P' = 304,34 ug/ml

Volumen recogido = 7 ml

Proteína total = 304,34 ug/ml x 7 ml = 2,13 mg

4.5.2.1.2.- Suero procedente del primer sangrado

CONEJO 1

a) Filtración

	<u>Tubo</u>	<u>D.O.</u>
P →	1	2,5
	2	2,52
	3	2,53
	4	2,41
	5	2,33
	6	0,755
	7	0,300
	8	0,174
	9	0,095
	10	0,125
	11	0,140
	12	0,023
	13	0,003

Volumen procesado = 1,5 ml de suero

P = Fracciones correspondientes a la muestra parcialmente
purificada una vez

D.O.280 P (dilución 1/10) = 0,330

Concentración P (dilución 1/10) = 239,13 ug/ml

Concentración P = 2,39 mg/ml

Volumen recogido = 22,5 ml

Proteína total = 2,39 mg/ml x 22,5 ml = 53,77 mg

Dilución de la muestra parcialmente purificada una vez = 1:15

b) Elución

	<u>Tubo</u>	<u>D.O.</u>
	1	0,045
	2	0,084
	3	0,959
P' →	4	0,728
	5	0,219
	6	0,112
	7	0,072
	8	0,056
	9	0,036
	10	0,020

P' = Fracciones correspondientes a inmunoglobulinas de
conejo anti-inmunoglobulinas de ratón

D.O.280 P' = 0,436

Concentración P' = 315,94 ug/ml

Volumen recogido = 9 ml

Proteína total = 315,94 ug/ml x 9 ml = 2,84 mg

CONEJO 2

a) Filtración

	<u>Tubo</u>	<u>D.O.</u>
P -->	1	2,64
	2	2,62
	3	2,62
	4	2,60
	5	2,43
	6	0,745
	7	0,298
	8	0,207
	9	0,117
	10	0,066
	11	0,038

Volumen procesado = 1,5 ml de suero

P = Fracciones correspondientes a la muestra parcialmente purificada una vez

D.O.280 P (dilución 1/10) = 0,326

Concentración P (dilución 1/10) = 236,23 ug/ml

Concentración P = 2,36 mg/ml

Volumen recogido = 12 ml

Proteína total = 2,36 mg/ml x 12 ml = 28,32 mg

Dilución de la muestra parcialmente purificada una vez = 1:8

b) Elución

	<u>Tubo</u>	<u>D.O.</u>
	1	0,059
	2	0,050
P' -->	3	0,465
	4	1,304
	5	0,336
	6	0,131
	7	0,083
	8	0,063
	9	0,046
	10	0,034

P' = Fracciones correspondientes a inmunoglobulinas de
conejo anti-inmunoglobulinas de ratón

D.O.280 P' = 0,675

Concentración P' = 489,13 ug/ml

Volumen recogido = 10 ml

Proteína total = 489,13 ug/ml x 10 ml = 4,89 mg

4.5.2.2.- SEGUNDA PURIFICACION

4.5.2.2.1.- Suero procedente del primer sangrado

CONEJO 1

a) Filtración

	<u>Tubo</u>	<u>D.O.</u>
P →	1	1,764
	2	1,703
	3	1,690
	4	1,380
	5	0,509
	6	0,086
	7	0,034
	8	0,018
	9	0,010
	10	0,005

Volumen procesado = 5,8 ml

Predilución de la muestra procesada = 1:15

P = Fracciones correspondientes a la muestra parcialmente
purificada dos veces

D.O.280 P (dilución 1/10) = 0,141

Concentración P (dilución 1/10) = 102,17 ug/ml

Concentración P = 1,02 mg/ml

Volumen recogido = 15,5 ml

Proteína total = 1,02 mg/ml x 15,5 ml = 15,81 mg

Dilución de la muestra parcialmente purificada dos veces = 1:40

4.5.3.- AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS IgG DEL SUERO ANTI-IDIOTIPICO MEDIANTE COLUMNA DE PROTEINA A-SEPHAROSA 4B

a) Elución

	<u>Tubo</u>	<u>D.O.</u>
	1	0,030
P --> [2	0,692
	3	0,390
	4	0,019
	5	0,000
	6	0,004
	7	0,008

Volumen procesado = 6 ml del suero purificado en apartado 4.5.2.2.1.

Predilución de la muestra procesada = 1:40

P = Fracciones correspondientes a inmunoglobulinas IgG

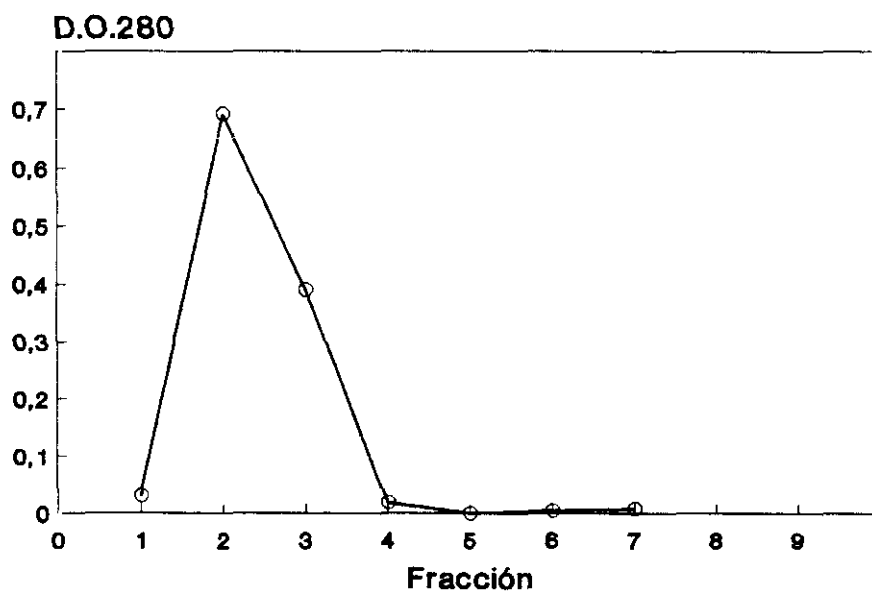
D.O.280 P = 0,535

Concentración P = 387,68 ug/ml

Volumen recogido = 4,5 ml

Proteína total = 387,68 ug/ml x 4,5 ml = 1,74 mg

FIGURA 66
Columna Proteína A-Sepharosa 4B



4.5.4.- CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO

4.5.4.1.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTI-ISOTIPICA

4.5.4.1.1.- Muestra preliminar de suero parcialmente purificada una vez

TABLA CX

1/Dil. M S	200	400	800	1.000	2.000	4.000	8.000	10.000	P.B.S.
D.O.	1,536	1,160	0,881	0,777	0,506	0,307	0,184	0,168	0,057
SC 1	1,512	1,207	0,954	0,832	0,523	0,312	0,188	0,164	0,057
D.O.	2,453	2,213	2,111	1,963	1,750	1,518	1,079	0,892	0,082
SC 2	2,190	2,222	2,126	1,812	1,605	1,253	1,093	0,816	0,061
D.O.	0,455	0,302	0,217	0,193	0,125	0,097	0,073	-----	0,057
SC -	0,477	0,335	0,209	0,171	0,123	0,106	0,071	-----	0,057
\bar{X} D.O. SC 1	1,467	1,126	0,860	0,747	0,457	0,252	0,129	0,109	-----
\bar{X} D.O. SC 2	2,250	2,146	2,047	1,816	1,606	1,314	1,015	0,783	-----
\bar{X} D.O. SC -	0,409	0,261	0,156	0,125	0,067	0,044	0,015	-----	-----

Tapizado = Inmunoglobulinas de ratón a 5 ug/ml

1/Dil. M S = Inversa de la dilución de la muestra preliminar de suero parcialmente purificada una vez

D.O. = Densidad óptica

\bar{X} D.O. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente al control de P.B.S.

SC 1 = Suero del conejo 1

SC 2 = Suero del conejo 2

SC - = Suero de conejo control negativo

Dilución del conjugado = 1/1.500

TABLA CXI

1/Dil. 1º S	2.000	4.000	5.000	8.000	10.000	15.000	16.000	20.000	30.000	32.000	40.000	60.000	P.B.S.
D.O.	0,561	0,353	-----	0,212	-----	-----	0,157	-----	-----	0,104	-----	-----	0,063
SC 1	0,532	0,328	-----	0,192	-----	-----	0,131	-----	-----	0,100	-----	-----	0,061
D.O.	-----	-----	0,838	-----	0,632	0,586	-----	0,415	0,411	-----	0,257	0,216	0,058
SC 2	-----	-----	0,837	-----	0,594	0,546	-----	0,381	0,365	-----	0,235	0,226	0,058
D.O.	0,094	0,077	0,074	0,070	0,069	0,068	0,065	0,063	0,064	0,066	0,060	0,059	0,072
SC -	0,097	0,080	0,073	0,069	0,067	0,064	0,065	0,061	0,066	0,067	0,058	0,057	0,073
\bar{X} D.O. SC 1	0,484	0,278	-----	0,140	-----	-----	0,082	-----	-----	0,040	-----	-----	-----
\bar{X} D.O. SC 2	-----	-----	0,779	-----	0,555	0,508	-----	0,340	0,330	-----	0,188	0,163	-----
\bar{X} D.O. SC -	0,023	0,006	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

Tapizado = Inmunoglobulinas de ratón a 5 ug/ml

1/Dil. 1º S = Inversa de la dilución del suero procedente del primer sangrado parcialmente purificado una vez

D.O. = Densidad óptica

\bar{X} D.O. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente al control de P.B.S.

SC 1 = Suero del conejo 1

SC 2 = Suero del conejo 2

SC - = Suero de conejo control negativo

Dilución del conjugado = 1/1.500

4.5.4.2.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTI-IDIOTIPICA

4.5.4.2.1.- Muestra preliminar de suero parcialmente purificada una vez

TABLA CXII

1/Dil. M S	200	400	800	1.000	2.000	4.000	8.000	10.000	P.B.S.
D.O.	2,787	2,681	2,637	2,659	2,383	1,924	1,458	1,219	0,074
SC 1	2,754	2,606	2,578	2,546	2,294	1,866	1,344	1,214	0,070
D.O.	2,345	2,522	2,681	2,741	2,706	2,598	2,308	2,008	0,045
SC 2	3,045	3,116	3,061	2,983	2,829	2,720	2,425	2,136	0,050
D.O.	0,676	0,463	0,369	0,324	0,223	0,160	0,116	-----	0,074
SC -	0,876	0,572	0,417	0,343	0,212	0,156	0,118	-----	0,070
\bar{X} D.O. SC 1	2,698	2,571	2,535	2,530	2,266	1,823	1,329	1,114	-----
\bar{X} D.O. SC 2	2,648	2,772	2,824	2,815	2,720	2,612	2,319	2,025	-----
\bar{X} D.O. SC -	0,704	0,445	0,321	0,261	0,145	0,086	0,045	-----	-----

Tapizado = Anticuerpo monoclonal TC-1 (idiotipo) a 5 ug/ml

1/Dil. M S = Inversa de la dilución de la muestra preliminar de suero parcialmente purificada una vez

D.O. = Densidad óptica

\bar{X} D.O. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente al control de P.B.S.

SC 1 = Suero del conejo 1

SC 2 = Suero del conejo 2

SC - = Suero de conejo control negativo

Dilución del conjugado = 1/1.500

TABLA CXIII

1/Dil. M S	200	400	800	1.000	2.000	4.000	8.000	10.000	P.B.S.
D.O.	2,241	2,100	1,825	1,621	1,276	0,867	0,489	0,431	0,090
SC 1	2,263	2,004	1,740	1,591	1,228	0,808	0,483	0,423	0,091
D.O.	2,581	2,537	2,611	2,534	2,402	1,984	1,579	1,401	0,071
SC 2	3,010	2,972	3,191	2,660	2,581	1,871	1,716	1,465	0,074
D.O.	0,822	0,507	0,378	0,350	0,234	0,189	0,147	-----	0,090
SC -	0,740	0,588	0,409	0,349	0,238	0,188	0,140	-----	0,091
\bar{X} D.O. SC 1	2,162	1,962	1,692	1,516	1,162	0,747	0,396	0,337	-----
\bar{X} D.O. SC 2	2,723	2,682	2,829	2,525	2,419	1,855	1,575	1,361	-----
\bar{X} D.O. SC -	0,691	0,457	0,303	0,259	0,146	0,098	0,053	-----	-----

Tapizado = Anticuerpo monoclonal TC-2 a 5 ug/ml

1/Dil. M S = Inversa de la dilución de la muestra preliminar de suero parcialmente purificada una vez

D.O. = Densidad óptica

\bar{X} D.O. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente al control de P.B.S.

SC 1 = Suero del conejo 1

SC 2 = Suero del conejo 2

SC - = Suero de conejo control negativo

Dilución del conjugado = 1/1.500

TABLA CXIV

1/Dil. 1º S	2.000	4.000	5.000	8.000	10.000	15.000	16.000	20.000	30.000	32.000	40.000	60.000	P.B.S.
D.O.	2,443	2,358	-----	1,901	-----	-----	1,619	-----	-----	1,255	-----	-----	0,059
SC 1	2,602	2,303	-----	2,006	-----	-----	1,601	-----	-----	1,175	-----	-----	0,060
D.O.	-----	-----	1,989	-----	1,648	1,558	-----	1,232	1,208	-----	0,831	0,796	0,054
SC 2	-----	-----	1,878	-----	1,556	1,484	-----	1,204	1,140	-----	0,816	0,745	0,055
D.O.	0,103	0,080	0,075	0,070	0,071	0,072	0,072	0,073	0,072	0,074	0,073	0,070	0,078
SC -	0,095	0,079	0,077	0,079	0,076	0,075	0,073	0,073	0,076	0,077	0,076	0,069	0,074
\bar{X} D.O. SC 1	2,463	2,271	-----	1,894	-----	-----	1,551	-----	-----	1,156	-----	-----	-----
\bar{X} D.O. SC 2	-----	-----	1,879	-----	1,548	1,467	-----	1,164	1,120	-----	0,769	0,716	-----
\bar{X} D.O. SC -	0,023	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-----

Tapizado = Anticuerpo monoclonal TC-1 (idiotipo) a 5 ug/ml

1/Dil. 1º S = Inversa de la dilución del suero procedente del primer sangrado parcialmente purificado una vez

D.O. = Densidad óptica

\bar{X} D.O. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente al control de P.B.S.

SC 1 = Suero del conejo 1

SC 2 = Suero del conejo 2

SC - = Suero de conejo control negativo

Dilución del conjugado = 1/1.500

4.5.4.2.2. - Suero procedente del primer sangrado parcialmente purificado una vez

TABLA CXV

1/Dil. 1º S	2.000	4.000	5.000	8.000	10.000	15.000	16.000	20.000	30.000	32.000	40.000	60.000	P.B.S.
D.O. SC 1	1,838 1,857	1,522 1,461	----- -----	1,014 1,031	----- -----	----- -----	0,677 0,651	----- -----	----- -----	0,373 0,440	----- -----	----- -----	0,083 0,087
D.O. SC 2	----- -----	----- -----	1,512 1,503	----- -----	0,960 1,052	0,938 0,980	----- -----	0,655 0,650	0,593 0,650	----- -----	0,419 0,463	0,401 0,426	0,081 0,088
D.O. SC -	0,154 0,158	0,130 0,141	0,127 0,133	0,128 0,136	0,121 0,130	0,119 0,128	0,115 0,136	0,115 0,132	0,116 0,129	0,118 0,112	0,117 0,110	0,113 0,118	0,115 0,118
\bar{X} D.O. SC 1	1,762	1,406	-----	0,937	-----	-----	0,579	-----	-----	0,321	-----	-----	-----
\bar{X} D.O. SC 2	-----	-----	1,423	-----	0,922	0,875	-----	0,568	0,537	-----	0,357	0,329	-----
\bar{X} D.O. SC -	0,040	0,019	0,014	0,016	0,009	0,007	0,009	0,007	0,006	0,000	0,000	0,000	-----

428

Tapizado = Anticuerpo monoclonal TC-2 a 5 ug/ml

1/Dil. 1º S = Inversa de la dilución del suero procedente del primer sangrado parcialmente purificado una vez

D.O. = Densidad óptica

\bar{X} D.O. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente al control de P.B.S.

SC 1 = Suero del conejo 1

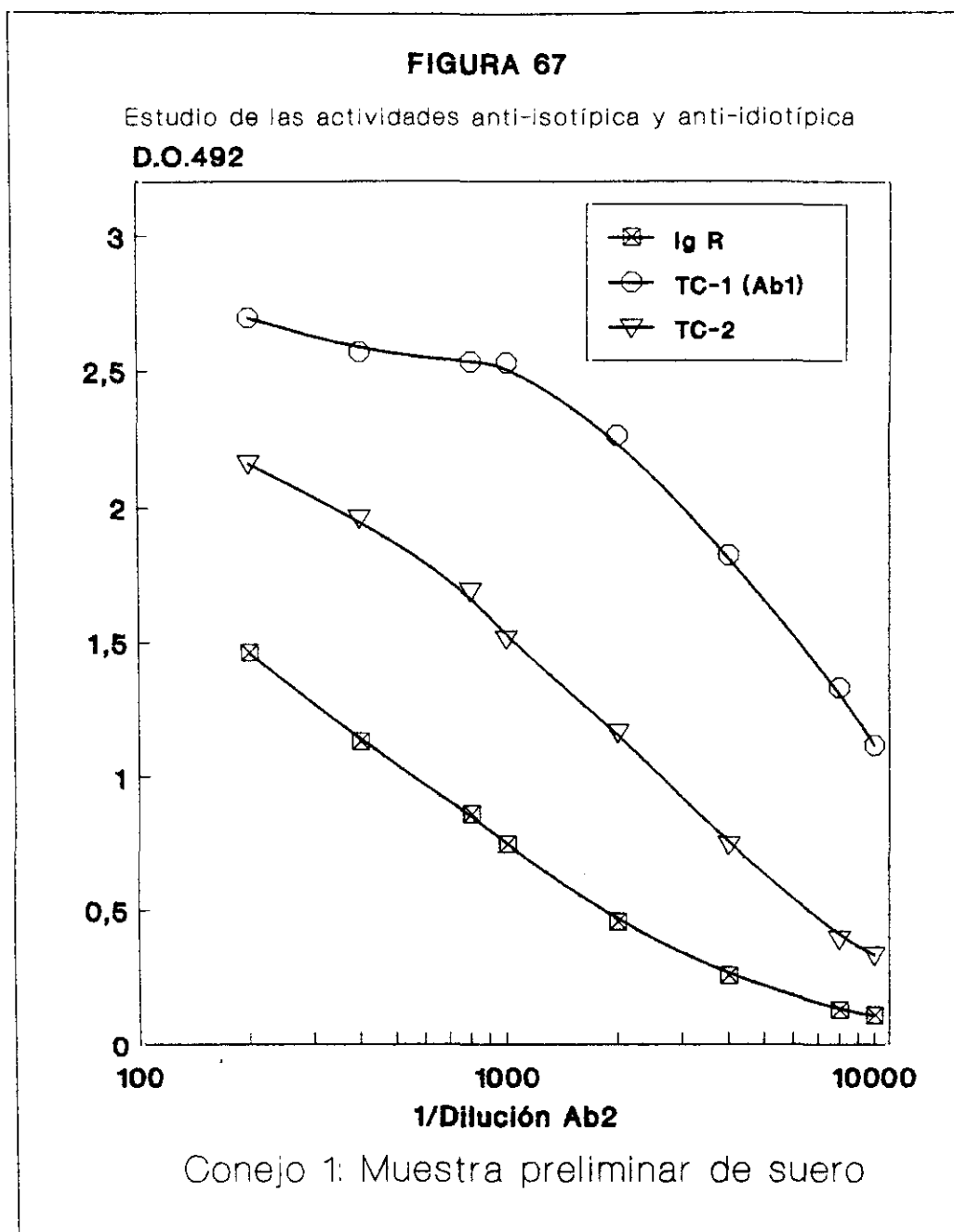
SC 2 = Suero del conejo 2

SC - = Suero de conejo control negativo

Dilución del conjugado = 1/1.500

4.5.4.3.- REPRESENTACION GRAFICA DE ACTIVIDAD ANTI-ISOTÍPICA Y ANTI-IDIOTÍPICA

4.5.4.3.1.- Muestra preliminar de suero parcialmente purificada una vez



Tapizado = 5 ug/ml de inmunoglobulinas de ratón (Ig R)

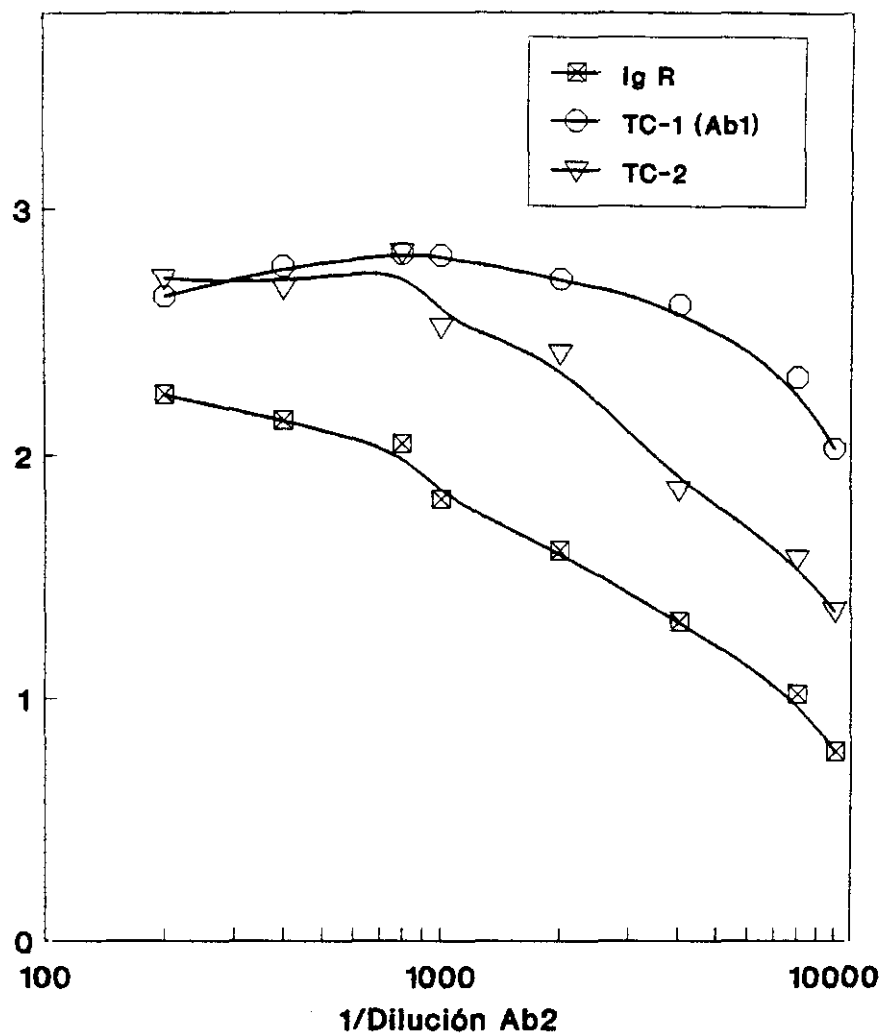
5 ug/ml del anticuerpo monoclonal TC-1 (Ab1 = anticuerpo idiотípico)

5 ug/ml del anticuerpo monoclonal TC-2

Ab2 = Suero anti-idiotípico

FIGURA 68

Estudio de las actividades anti-isotópica y anti-idiotípica
D.O.492



Conejo 2: Muestra preliminar de suero

Tapizado = 5 ug/ml de inmunoglobulinas de ratón (Ig R)

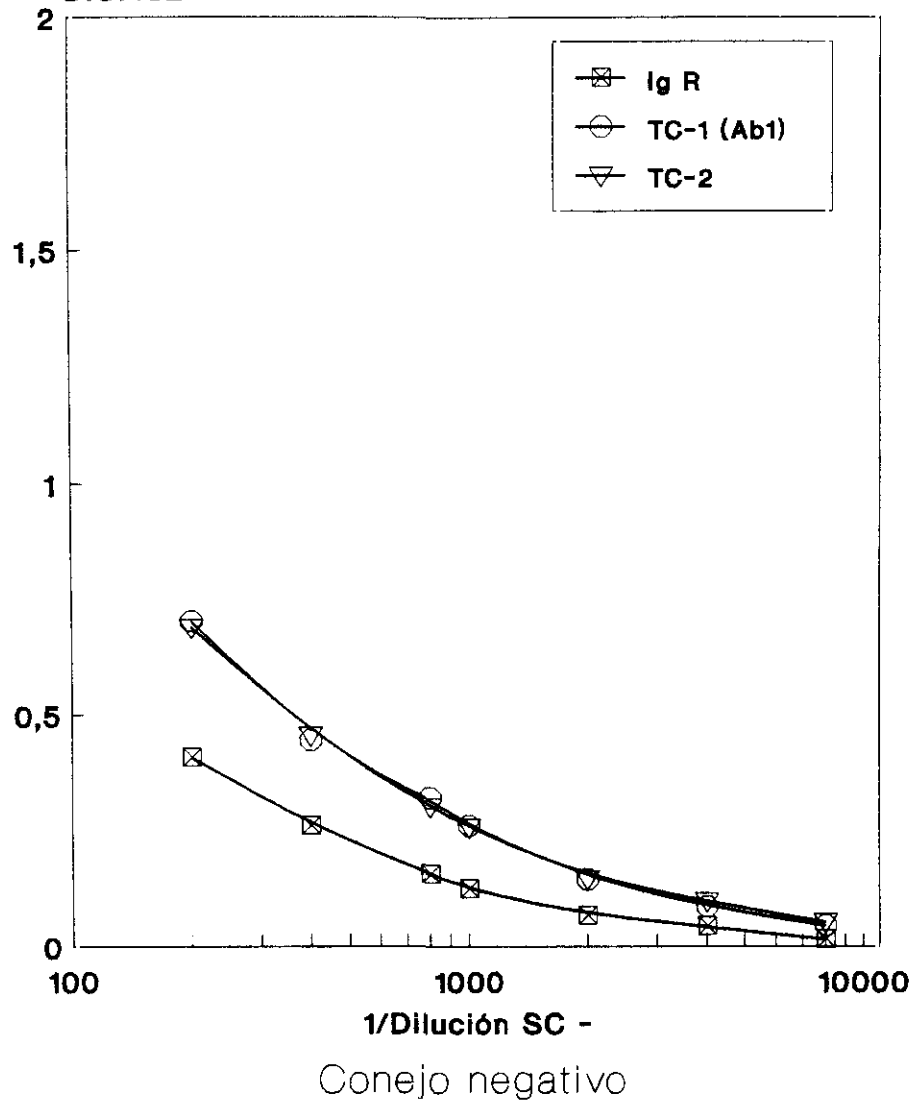
5 ug/ml del anticuerpo monoclonal TC-1 (Ab1 = anticuerpo idiopico)

5 ug/ml del anticuerpo monoclonal TC-2

Ab2 = Suero anti-idiotipico

FIGURA 69

Estudio de las actividades anti-isotípica y anti-idiotípica
D.O.492



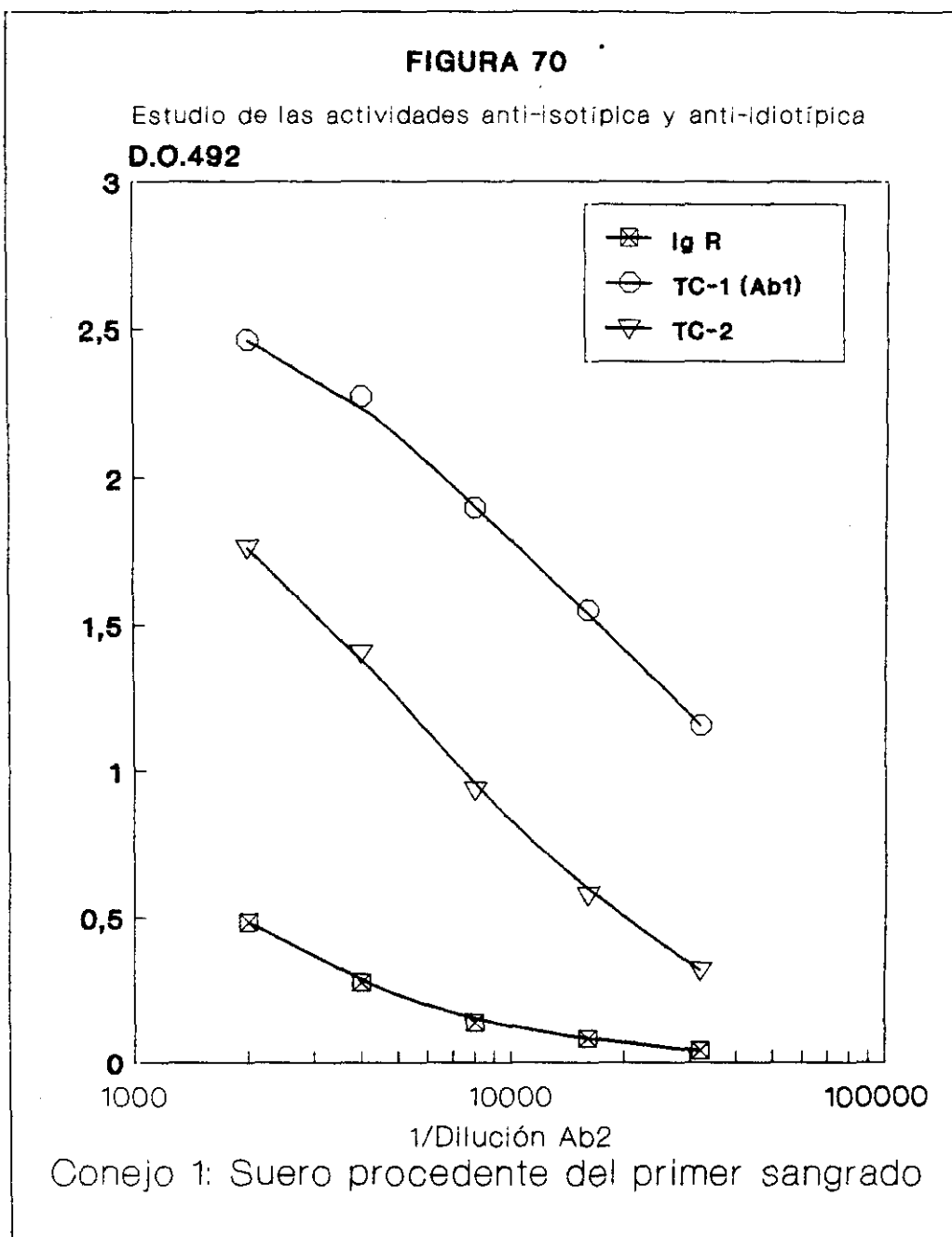
Tapizado = 5 ug/ml de inmunoglobulinas de ratón (Ig R)

5 ug/ml del anticuerpo monoclonal TC-1 (Ab1 = anticuerpo idiopico)

5 ug/ml del anticuerpo monoclonal TC-2

SC - = Suero de conejo negativo

4.5.4.3.2.- Suero procedente del primer sangrado parcialmente purificado una vez



Tapizado = 5 ug/ml de inmunoglobulinas de ratón (Ig R)

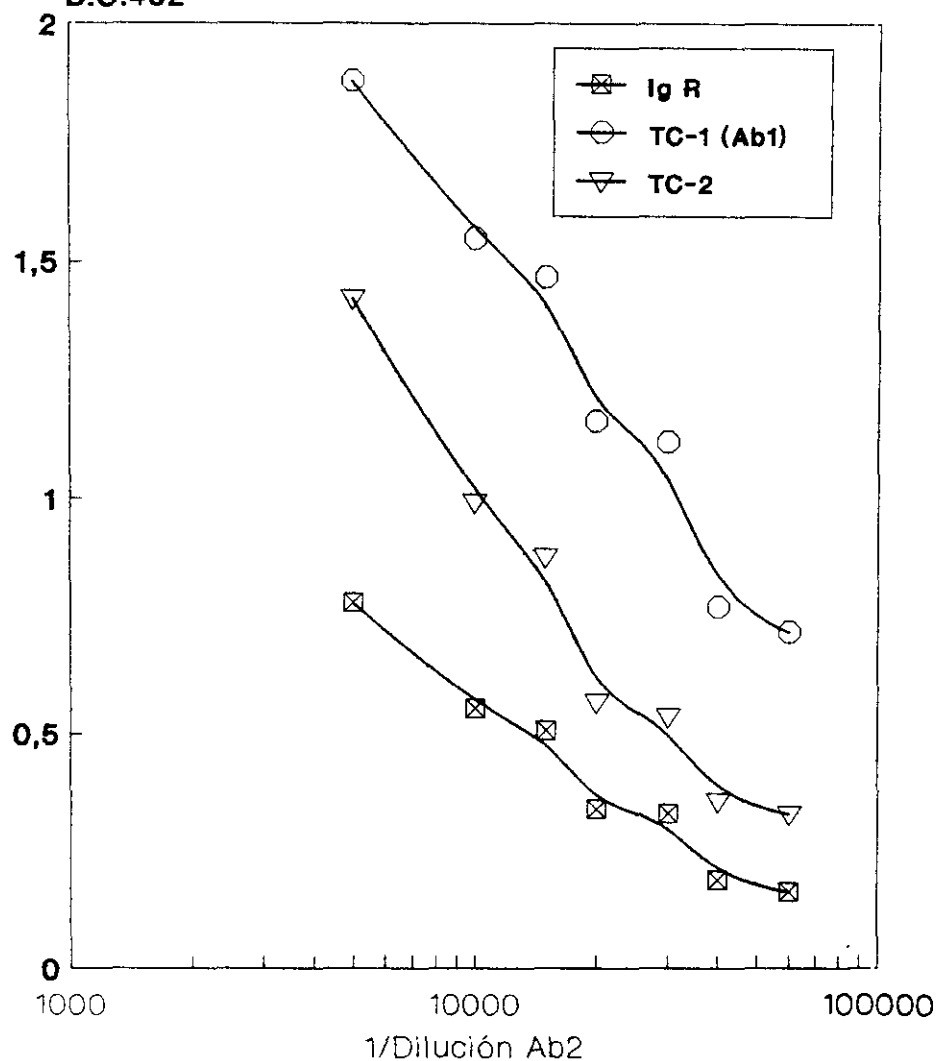
5 ug/ml del anticuerpo monoclonal TC-1 (Ab1 = anticuerpo idiopico)

5 ug/ml del anticuerpo monoclonal TC-2

Ab2 = Suero anti-idiotipico

FIGURA 71

Estudio de las actividades anti-isotípica y anti-idiotípica
D.O.492



Conejo 2: Suero procedente del primer sangrado

Tapizado = 5 ug/ml de inmunoglobulinas de ratón (Ig R)

5 ug/ml del anticuerpo monoclonal TC-1 (Ab1 = anticuerpo idiотípico)

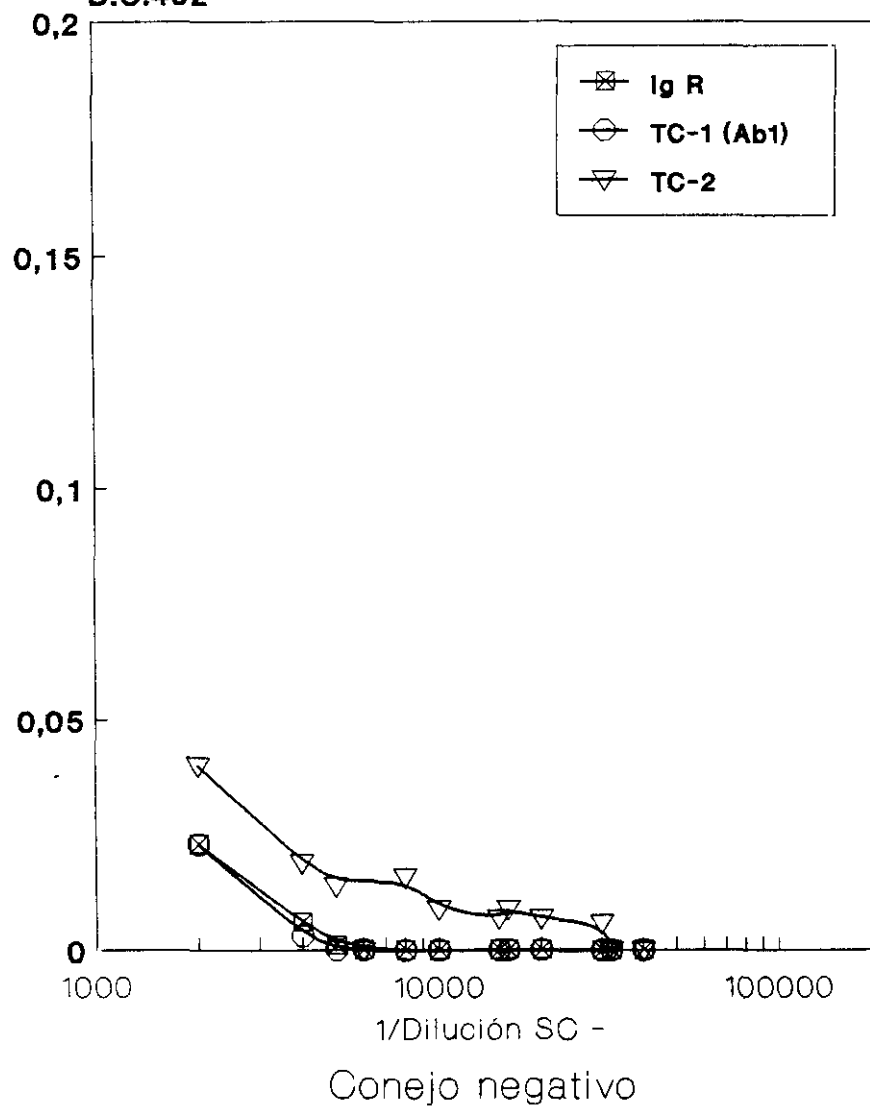
5 ug/ml del anticuerpo monoclonal TC-2

Ab2 = Suero anti-idiotípico

FIGURA 72

Estudio de las actividades anti-isotípica y anti-idiotípica

D.O.492



Tapizado = 5 ug/ml de inmunoglobulinas de ratón (Ig R)

5 ug/ml del anticuerpo monoclonal TC-1 (Ab1 = anticuerpo idiotípico)

5 ug/ml del anticuerpo monoclonal TC-2

SC - = Suero de conejo negativo

4.5.4.4.- ESTUDIO DE LA SEMEJANZA ESTRUCTURAL ENTRE LOS ANTICUERPOS ANTI-IDIO-
TIPO Y EL ANTIGENO EXCRETOR-SECRETOR LARVARIO

4.5.4.4.1.- Estudios de inhibición de la unión del anticuerpo idiotípico (an-
ticuerpo monoclonal TC-1) al antígeno excretor-secretor larvario

4.5.4.4.1.1.- Mediante E.L.I.S.A.

a) Competición con el anticuerpo idiotípico a distintas concentraciones

TABLA CXVI
Muestra: TC-1

Con. TC-1	3	1,5	0,75	0,375	0,187	0,093	0,046	0,023	0,011	S -	S +
D.O.	0,817	0,679	0,683	0,697	0,614	0,608	0,520	0,499	0,429	0,332	1,058
Ag E/S	0,856	0,807	0,768	0,733	0,680	0,679	0,646	0,546	0,440	0,406	0,997
D.O.	0,262	0,185	0,185	0,182	0,184	0,198	0,182	0,187	0,177	0,275	0,267
B.S.A.	0,264	0,200	0,169	0,212	0,145	0,199	0,182	0,182	0,168	0,211	0,246
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,573	0,550	0,548	0,518	0,482	0,445	0,401	0,338	0,262	0,126	0,771

TABLA CXVII
Muestra: TC-1 + Ab2 (1/2)

Con. TC-1	3	1,5	0,75	0,375	0,187	0,093	0,046	0,023	0,011	S -	S +
D.O.	0,430	0,229	0,251	0,231	0,216	0,240	0,236	0,220	0,233	0,332	1,058
Ag E/S	0,512	0,279	0,276	0,265	0,266	0,272	0,280	0,270	0,276	0,406	0,997
D.O.	0,269	0,220	0,212	0,215	0,205	0,243	0,200	0,233	0,210	0,275	0,267
B.S.A.	0,287	0,220	0,212	0,215	0,205	0,243	0,200	0,233	0,210	0,211	0,246
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,193	0,034	0,051	0,033	0,036	0,013	0,058	0,012	0,044	0,126	0,771
% Inh.	66,32	93,82	90,70	93,63	92,54	97,08	85,54	96,45	83,21	---	---

Ab2 (1/2) = Suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado una vez (dilución tras el paso por columna = 1:15), utilizado en el ensayo a la dilución 1/2

Conc. TC-1 = Concentración del anticuerpo monoclonal TC-1 (anticuerpo idiotípico) en ug/ml

S - = Suero murino control negativo; S + = Suero murino control positivo

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

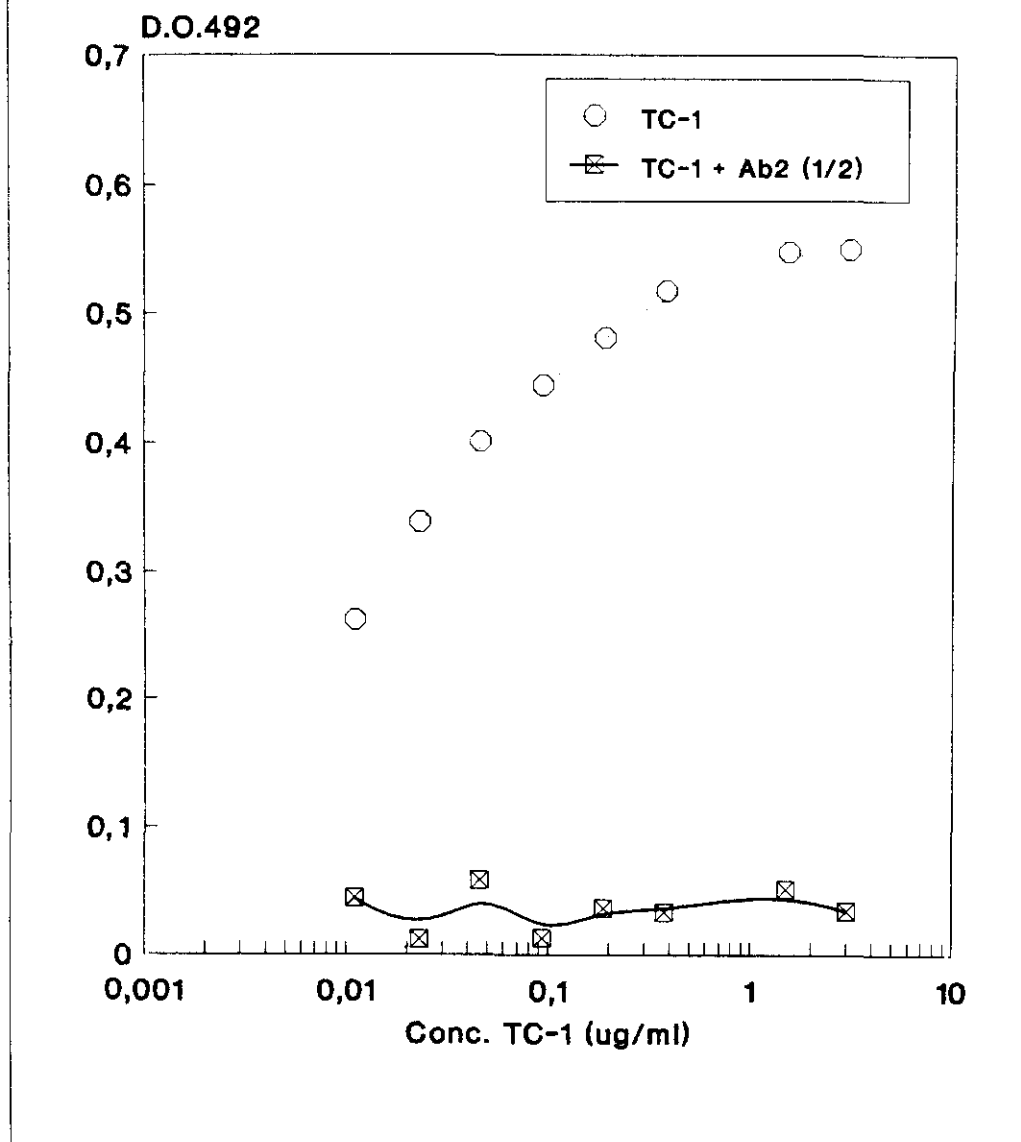
D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

% Inh. = Porcentaje de inhibición en la unión del anticuerpo monoclonal TC-1 al antígeno excretor-secretor larvario

Dilución del conjugado = 1/100

FIGURA 73
E.L.I.S.A. de Inhibición



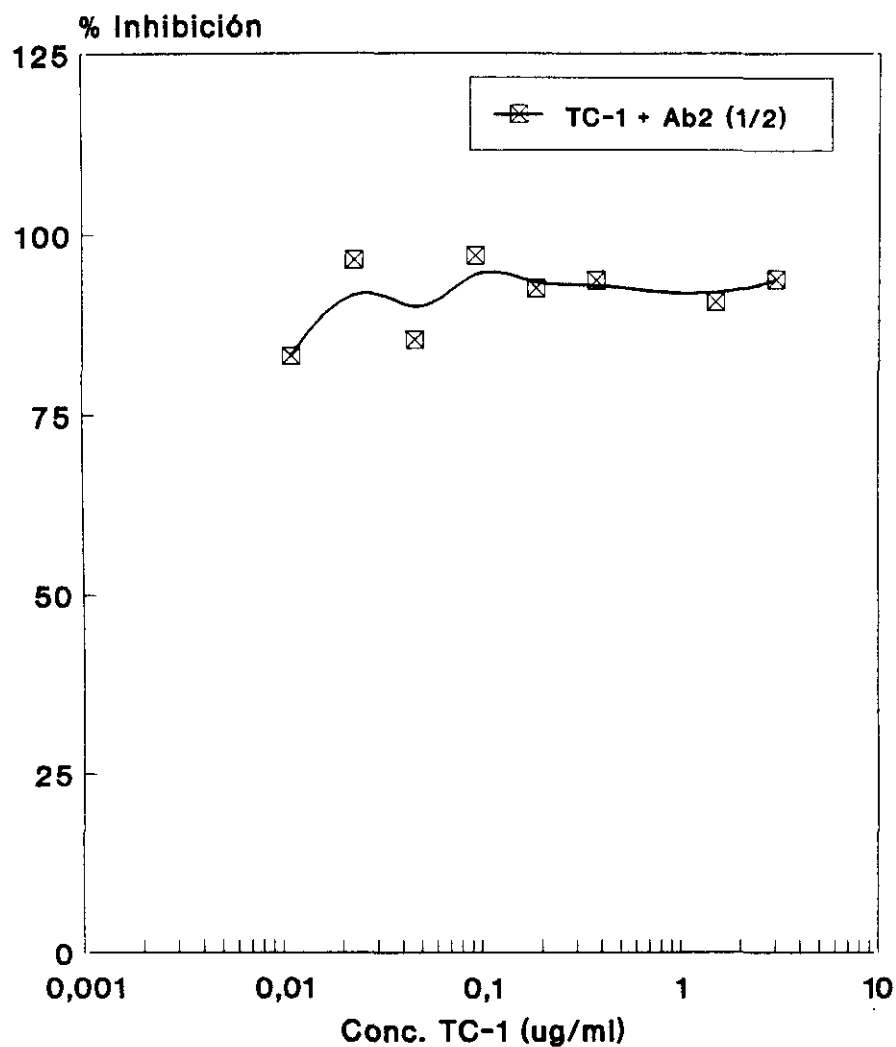
Tapizado = Antígeno excretor-secretor larvario a 0,12 ug/ml

Muestras ensayadas:

TC-1 = Anticuerpo monoclonal TC-1 (Tabla CXVI)

TC-1 + Ab2 (1/2) = Anticuerpo monoclonal y suero anti-idiotípico a la dilución 1/2, incubados previamente (Tabla CXVII)

FIGURA 74
E.L.I.S.A. de Inhibición



Tapizado = Antígeno excretor-secretor larvario a 0,12 ug/ml

Muestra ensayada:

TC-1 + Ab2 (1/2) = Anticuerpo monoclonal TC-1 y suero anti-idiotípico a la dilución 1/2, incubados previamente (Tabla CXVII)

% Inhibición = Porcentaje de inhibición en la unión del anticuerpo monoclonal TC-1 al antígeno excretor-secretor larvario

TABLA CXVIII
Muestra: TC-1

Con. TC-1	15	7,5	3,75	1,87	0,93	0,46	0,23	0,11	S -	S +
D.O.	0,830	0,679	0,676	0,673	0,624	0,621	0,562	0,507	0,224	0,922
Ag E/S	0,703	0,633	0,693	0,667	0,592	0,580	0,526	0,522	0,255	0,876
D.O.	0,103	0,125	0,144	0,135	0,116	0,144	0,122	0,131	0,112	0,110
B.S.A.	0,143	0,154	0,159	0,156	0,162	0,152	0,165	0,167	0,160	0,155
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,643	0,517	0,533	0,525	0,469	0,452	0,401	0,365	0,103	0,767

TABLA CXIX
Muestra: TC-1 + Ab2 (1/2)

Con. TC-1	15	7,5	3,75	1,87	0,93	0,46	0,23	0,11	S -	S +
D.O.	0,782	0,606	0,439	0,166	0,158	0,194	0,177	0,167	0,224	0,922
Ag E/S	0,782	0,645	0,697	0,221	0,203	0,278	0,207	0,219	0,255	0,876
D.O.	0,154	0,113	0,118	0,120	0,120	0,117	0,124	0,124	0,112	0,110
B.S.A.	0,154	0,161	0,172	0,167	0,162	0,170	0,163	0,168	0,160	0,155
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,628	0,488	0,423	0,050	0,039	0,093	0,049	0,047	0,103	0,767
% Inh.	2,34	5,61	20,64	90,46	91,69	79,43	87,75	87,13	-----	-----

Ab2 (1/2) = Suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado una vez (dilución tras el paso por columna = 1:15), utilizado en el ensayo a la dilución 1/2

Conc. TC-1 = Concentración del anticuerpo monoclonal TC-1 (anticuerpo idiotípico) en ug/ml

S - = Suero murino control negativo; S + = Suero murino control positivo

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

% Inh. = Porcentaje de inhibición en la unión del anticuerpo monoclonal TC-1 al antígeno excretor-secretor larvario
Dilución del conjugado = 1/100

TABLA CXX
Muestra: TC-1 + Ab2 (1/3)

Con.TC-1	15	7,5	3,75	1,87	0,93	0,46	0,23	0,11	S -	S +
D.O.	0,645	0,648	0,657	0,219	0,219	0,211	0,243	0,234	0,224	0,922
Ag E/S	0,806	0,668	0,620	0,164	0,143	0,164	0,147	0,160	0,255	0,876
D.O.	0,133	0,137	0,144	0,143	0,134	0,146	0,142	0,142	0,112	0,110
B.S.A.	0,107	0,112	0,110	0,114	0,100	0,111	0,108	0,113	0,160	0,155
D.O. X-B.S.A.	0,605	0,531	0,511	0,063	0,064	0,059	0,070	0,070	0,103	0,767
% Inh.	5,91	0	0	88	86,36	86,95	82,55	80,83	-----	-----

TABLA CXXI
Muestra: TC-1 + Ab2 (1/6)

Con.TC-1	15	7,5	3,75	1,87	0,93	0,46	0,23	0,11	S -	S +
D.O.	0,862	0,750	0,742	0,565	0,196	0,202	0,215	0,192	0,224	0,922
Ag E/S	0,947	0,801	0,836	0,553	0,169	0,168	0,183	0,172	0,255	0,876
D.O.	0,129	0,127	0,126	0,131	0,128	0,125	0,131	0,134	0,112	0,110
B.S.A.	0,104	0,114	0,114	0,116	0,115	0,117	0,128	0,124	0,160	0,155
D.O. X-B.S.A.	0,788	0,655	0,669	0,436	0,061	0,064	0,070	0,053	0,103	0,767
% Inh.	0	0	0	16,96	87	85,85	82,55	85,48	-----	-----

Ab2 (1/3), (1/6) = Suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado

una vez (dilución tras el paso por columna = 1:15), utilizado en el ensayo a dilución 1/3 y 1/6

Conc. TC-1 = Concentración del anticuerpo monoclonal TC-1 (anticuerpo idiotípico) en ug/ml

S - = Suero murino control negativo; S + = Suero murino control positivo

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

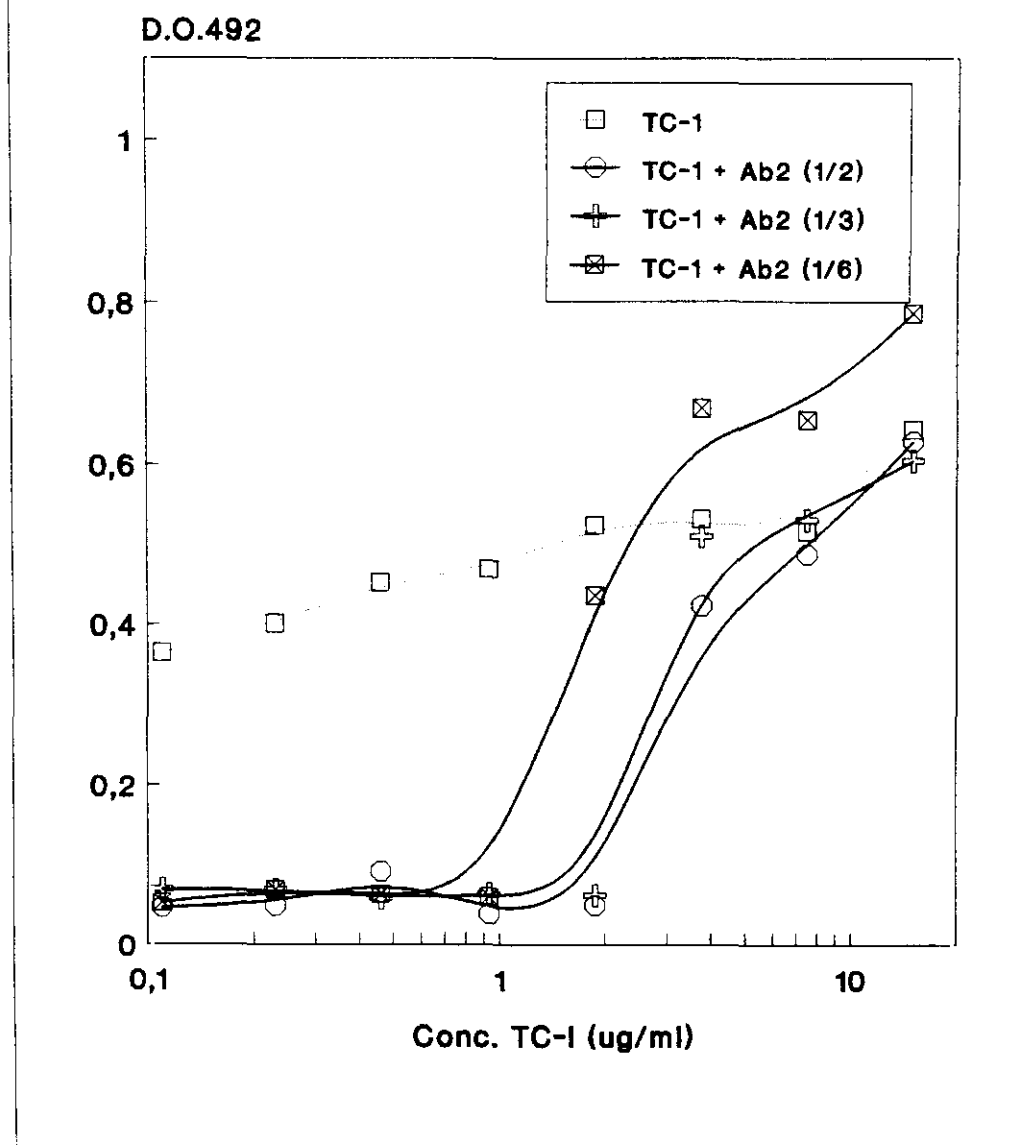
D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. X-B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

% Inh. = Porcentaje de inhibición en la unión del anticuerpo monoclonal TC-1 al antígeno excretor-secretor larvario

Dilución del conjugado = 1/100

FIGURA 75
E.L.I.S.A. de Inhibición



Tapizado = Antígeno excretor-secretor larvario a 0,12 ug/ml

Muestras ensayadas:

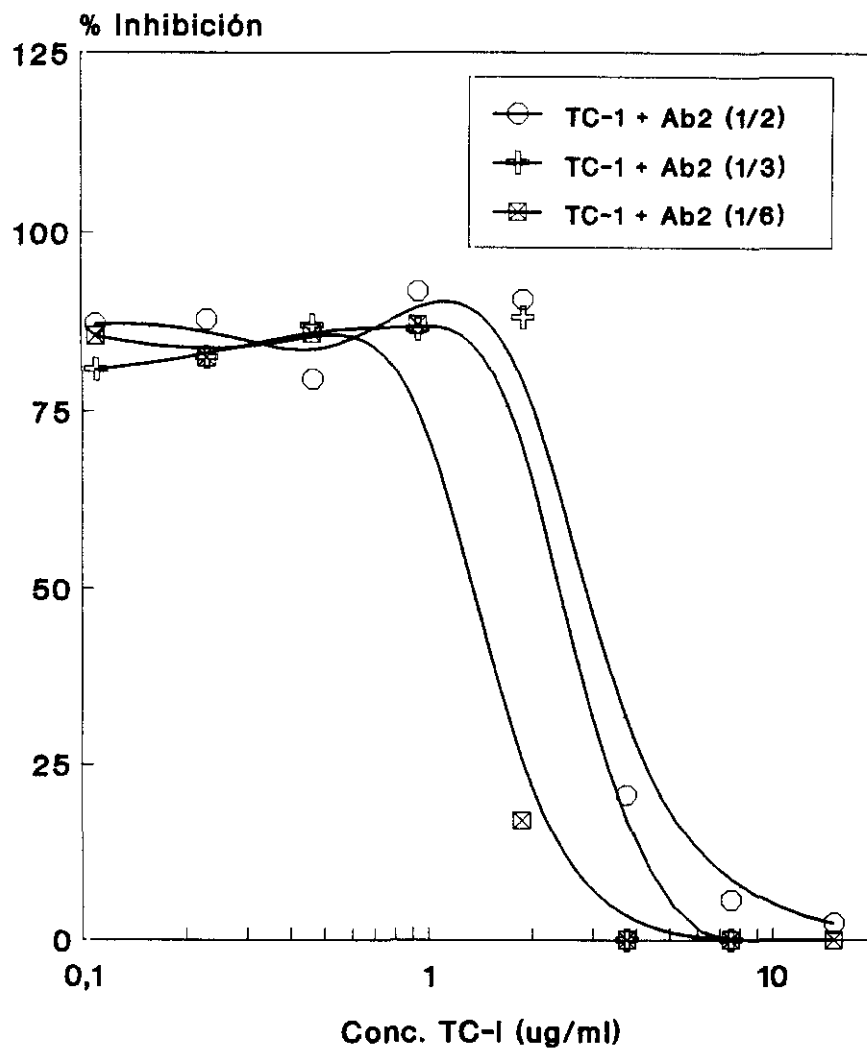
TC-1 = Anticuerpo monoclonal TC-1 (Tabla CXVIII)

TC-1 + Ab2 (1/2) = TC-1 y suero anti-idiotípico a la dilución 1/2, incubados previamente (Tabla CXIX)

TC-1 + Ab2 (1/3) = TC-1 y Ab2 a la dilución 1/3, incubados previamente (Tabla CXX)

TC-1 + Ab2 (1/6) = TC-1 y Ab2 a la dilución 1/6, incubados previamente (Tabla CXXI)

FIGURA 76
E.L.I.S.A. de Inhibición



Tapizado = Antígeno excretor-secretor larvario (E/S) a 0,12 ug/ml

Muestras ensayadas:

TC-1 + Ab2 (1/2) = Anticuerpo monoclonal TC-1 y suero anti-idiotípico a la dilución 1/2, incubados previamente (Tabla CXIX)

TC-1 + Ab2 (1/3) = TC-1 y Ab2 a la dilución 1/3, incubados previamente (Tabla CXX)

TC-1 + Ab2 (1/6) = TC-1 y Ab2 a la dilución 1/6, incubados previamente (Tabla CXXI)

% Inhibición = Porcentaje de inhibición en la unión de TC-1 al antígeno E/S

TABLA CXXII
Muestra: TC-1

Con. TC-1	15	7,5	3,75	1,87	0,93	0,46	0,23	0,11	S -	S +
D.O.	0,751	0,763	0,732	0,627	0,661	0,685	0,663	0,588	0,240	0,957
Ag E/S	0,740	0,696	0,661	0,609	0,588	0,638	0,586	0,552	0,223	0,723
D.O.	0,135	0,146	0,139	0,162	0,145	0,140	0,155	0,155	0,138	0,146
B.S.A.	0,175	0,183	0,170	0,175	0,238	0,246	0,164	0,195	0,142	0,172
D.O. X-B.S.A.	0,590	0,565	0,542	0,450	0,433	0,468	0,465	0,395	0,091	0,681

TABLA CXXIII
Muestra: TC-1 + Ab2 (1/12)

Con. TC-1	15	7,5	3,75	1,87	0,93	0,46	0,23	0,11	S -	S +
D.O.	0,834	0,747	0,588	0,615	0,502	0,195	0,201	0,188	0,240	0,957
Ag E/S	0,834	0,807	0,711	0,661	0,555	0,254	0,210	0,208	0,223	0,723
D.O.	0,191	0,135	0,130	0,125	0,130	0,121	0,123	0,126	0,138	0,146
B.S.A.	0,191	0,173	0,177	0,173	0,174	0,168	0,173	0,126	0,142	0,172
D.O. X-B.S.A.	0,643	0,623	0,496	0,489	0,376	0,080	0,057	0,072	0,091	0,681
% Inh.	0	0	8,49	0	13,17	82,91	87,75	81,78	-----	-----

Ab2 (1/12) = Suero antiidiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado una vez (dilución tras el paso por columna = 1:15), utilizado en el ensayo a la dilución 1/12

Conc. TC-1 = Concentración del anticuerpo monoclonal TC-1 (anticuerpo idiотípico) en ug/ml

S - = Suero murino control negativo; S + = Suero murino control positivo

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. X-B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

% Inh. = Porcentaje de inhibición en la unión del anticuerpo monoclonal TC-1 al antígeno excretor-secretor larvario

Dilución del conjugado = 1/100

TABLA CXXIV
Muestra: TC-1 + Ab2 (1/24)

Con.TC-1	15	7,5	3,75	1,87	0,93	0,46	0,23	0,11	S -	S +
D.O.	0,875	0,752	0,671	0,674	0,549	0,345	0,195	0,191	0,240	0,957
Ag E/S	0,875	0,789	0,811	0,674	0,535	0,384	0,174	0,168	0,223	0,723
D.O.	0,179	0,149	0,139	0,139	0,136	0,133	0,155	0,167	0,138	0,146
B.S.A.	0,179	0,128	0,114	0,107	0,105	0,105	0,115	0,126	0,142	0,172
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,696	0,632	0,615	0,551	0,422	0,245	0,049	0,033	0,091	0,681
% Inh.	0	0	0	0	2,55	47,65	89,47	91,65	-----	-----

TABLA CXXV
Muestra: TC-1 + Ab2 (1/48)

Con.TC-1	15	7,5	3,75	1,87	0,93	0,46	0,23	0,11	S -	S +
D.O.	0,857	0,877	0,755	0,743	0,744	0,620	0,383	0,198	0,240	0,957
Ag E/S	0,857	0,828	0,833	0,770	0,763	0,577	0,383	0,198	0,223	0,723
D.O.	0,250	0,161	0,143	0,137	0,162	0,132	0,136	0,153	0,138	0,146
B.S.A.	0,250	0,207	0,149	0,161	0,245	0,124	0,136	0,153	0,142	0,172
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,607	0,668	0,648	0,607	0,550	0,470	0,247	0,045	0,091	0,681
% Inh.	0	0	0	0	0	0	46,89	88,61	-----	-----

Ab2 (1/24), (1/48) = Suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado una vez (dilución tras el paso por columna = 1:15), utilizado en el ensayo a dilución 1/24 y 1/48

Conc. TC-1 = Concentración del anticuerpo monoclonal TC-1 (anticuerpo idiотípico) en ug/ml

S - = Suero murino control negativo; S + = Suero murino control positivo

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

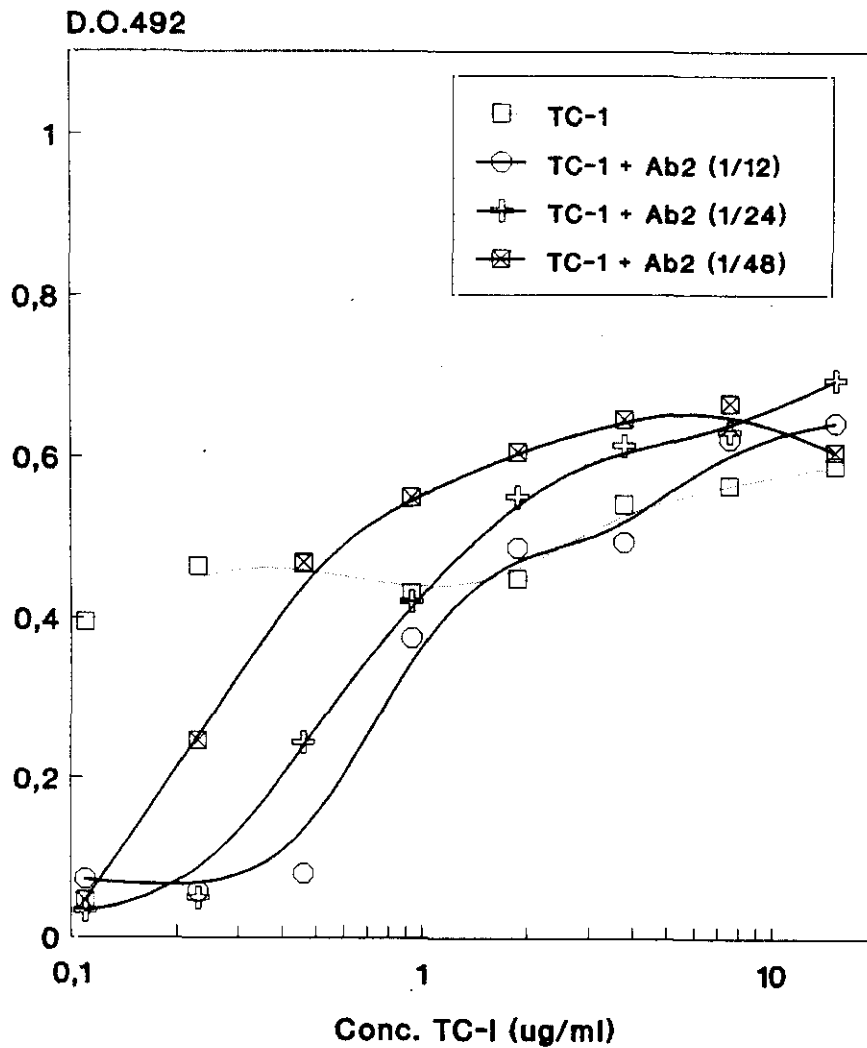
D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

% Inh. = Porcentaje de inhibición en la unión del anticuerpo monoclonal TC-1 al antígeno excretor-secretor larvario

Dilución del conjugado = 1/100

FIGURA 77
E.L.I.S.A. de Inhibición



Tapizado = Antígeno excretor-secretor larvario a 0,12 ug/ml

Muestras ensayadas:

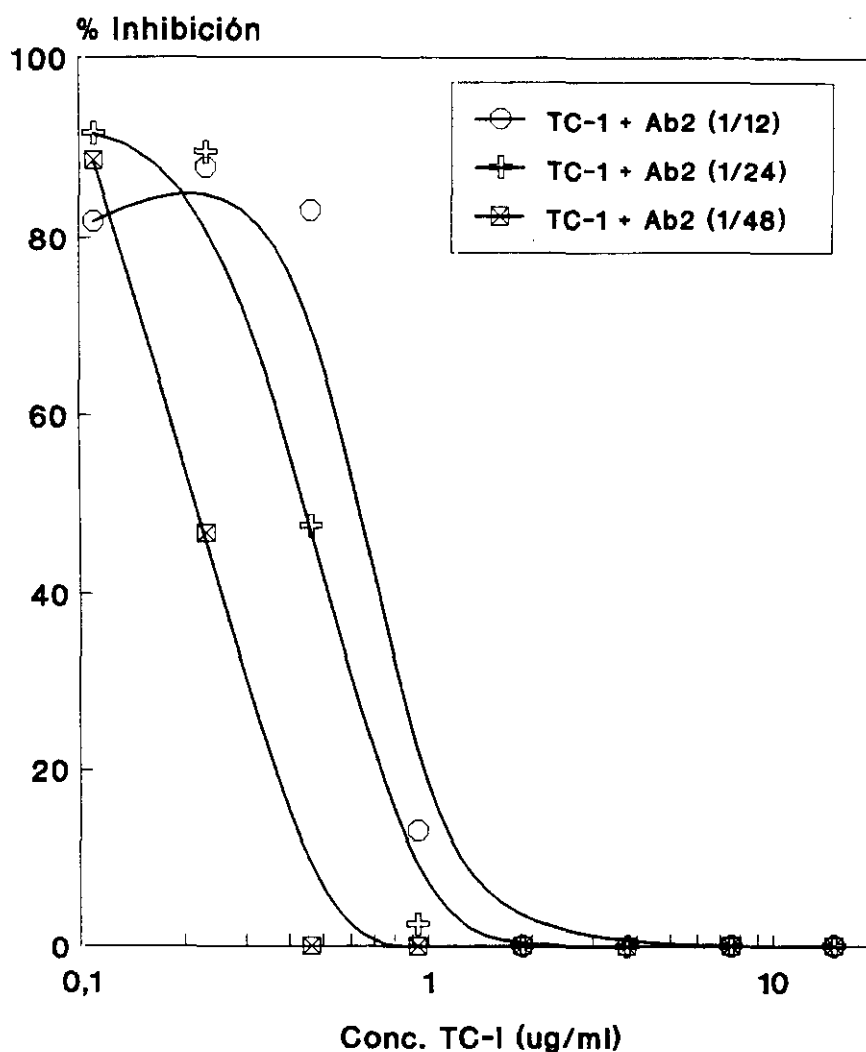
TC-1 = Anticuerpo monoclonal TC-1 (Tabla CXXII)

TC-1 + Ab2 (1/12) = TC-1 y suero anti-idiotípico a la dilución 1/12, incubados previamente (Tabla CXXIII)

TC-1 + Ab2 (1/24) = TC-1 y Ab2 a la dilución 1/24, incubados previamente (Tabla CXXIV)

TC-1 + Ab2 (1/48) = TC-1 y Ab2 a la dilución 1/48, incubados previamente (Tabla CXXV)

FIGURA 78
E.L.I.S.A. de Inhibición



Tapizado = Antígeno excretor-secretor larvario (E/S) a 0,12 ug/ml

Muestras ensayadas:

TC-1 + Ab2 (1/12) = Anticuerpo monoclonal TC-1 y suero anti-idiotípico a la dilución 1/12, incubados previamente (Tabla CXXIII)

TC-1 + Ab2 (1/24) = TC-1 y Ab2 a la dilución 1/24, incubados previamente (Tabla CXXIV)

TC-1 + Ab2 (1/48) = TC-1 y Ab2 a la dilución 1/48, incubados previamente (Tabla CXXV)

% Inhibición = Porcentaje de inhibición en la unión de TC-1 al antígeno E/S

b) Competición con el anticuerpo idiopático conjugado con biotina

b.1) Titulación del anticuerpo idiopático marcado

TABLA CXXVI

1/Dil. TC-1*	300	600	1.200	2.400	4.800	9.600	18.200	36.400
D.O.	2,703	2,755	2,749	2,685	2,250	1,796	1,082	0,638
Ag E/S	2,686	2,692	2,791	2,613	2,251	1,673	1,054	0,675
D.O.	0,033	0,042	0,042	0,045	0,045	0,040	0,034	0,030
B.S.A.	0,032	0,040	0,041	0,046	0,049	0,043	0,039	0,030
D.O. X-B.S.A.	2,622	2,682	2,729	2,564	2,203	1,693	1,032	0,626

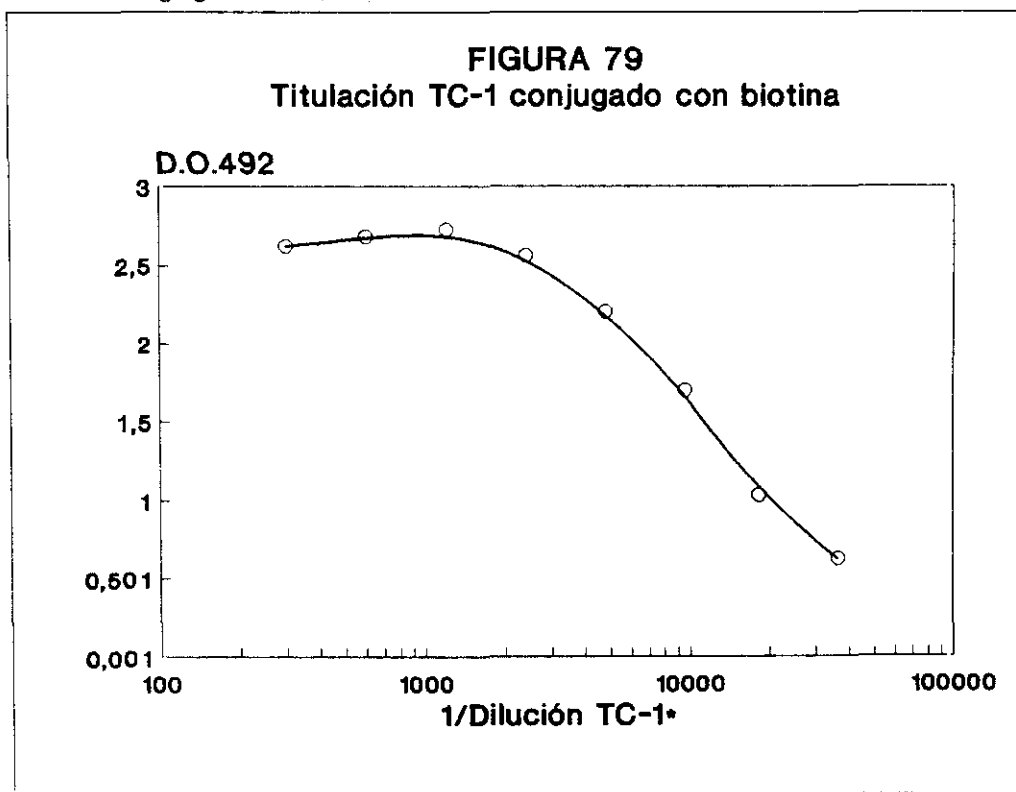
1/Dil. TC-1* = Inversa de la dilución del anticuerpo monoclonal TC-1 conjugado con biotina

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. X-B.S.A. = Valores medios de D.O. después de restar la correspondiente a la B.S.A.

Dilución del conjugado = 1/1.500



b.2) Ensayos de competición

TABLA CXXVII - Muestra: SC- + TC-1* (1/12.000)

C. SC -	44	22	11	5,5	2,75	1,375	0,687	TC-1*	TC-1*
D.O.	0,833	0,914	0,844	0,862	1,069	1,063	1,196	1,306	1,102
Ag E/S	0,746	0,892	0,865	0,810	0,922	1,010	1,153	1,167	1,254
D.O.	0,033	0,041	0,040	0,038	0,039	0,037	0,041	0,042	0,042
B.S.A.									
D.O.	0,756	0,862	0,814	0,798	0,996	0,999	1,133	1,194	1,136
\bar{X} -B.S.A.									
% Inh.	35,11	30,13	32,45	31,51	14,51	14,25	2,75	-----	-----

TABLA CXXVIII - Muestra: Ag E/S + TC-1* (1/12.000)

C. AgE/S	3	1,5	0,75	0,325	0,187	0,093	0,046	TC-1*	TC-1*
D.O.	0,045	0,047	0,050	0,053	0,059	0,083	0,128	1,306	1,102
Ag E/S	0,043	0,044	0,047	0,048	0,057	0,053	0,126	1,167	1,254
D.O.	0,039	0,039	0,038	0,038	0,038	0,038	0,041	0,042	0,042
B.S.A.									
D.O.	0,005	0,006	0,010	0,012	0,020	0,020	0,086	1,194	1,136
\bar{X} -B.S.A.									
% Inh.	99,58	99,49	99,15	98,97	98,29	98,29	92,62	-----	-----

TABLA CXXIX - Muestra: Ab2 + TC-1* (1/12.000)

C. Ab2	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,562	TC-1*	TC-1*
D.O.	0,043	0,042	0,042	0,043	0,085	0,426	0,787	1,306	1,102
Ag E/S	0,041	0,042	0,041	0,044	0,082	0,447	0,781	1,167	1,254
D.O.	0,030	0,039	0,041	0,040	0,041	0,041	0,040	0,042	0,042
B.S.A.									
D.O.	0,012	0,003	0,0005	0,003	0,042	0,395	0,744	1,194	1,136
\bar{X} -B.S.A.									
% Inh.	98,97	99,75	99,95	99,75	96,40	66,10	36,14	-----	-----

TC-1* = Anticuerpo monoclonal TC-1 conjugado con biotina

C. SC - = Concentración proteica del suero de conejo negativo (ug/ml)

C. Ag E/S = Concentración de antígeno excretor-secretor larvario (ug/ml)

C. Ab2 = Concentración de la fracción IgG del suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1 parcialmente purificado dos veces (ug/ml)

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

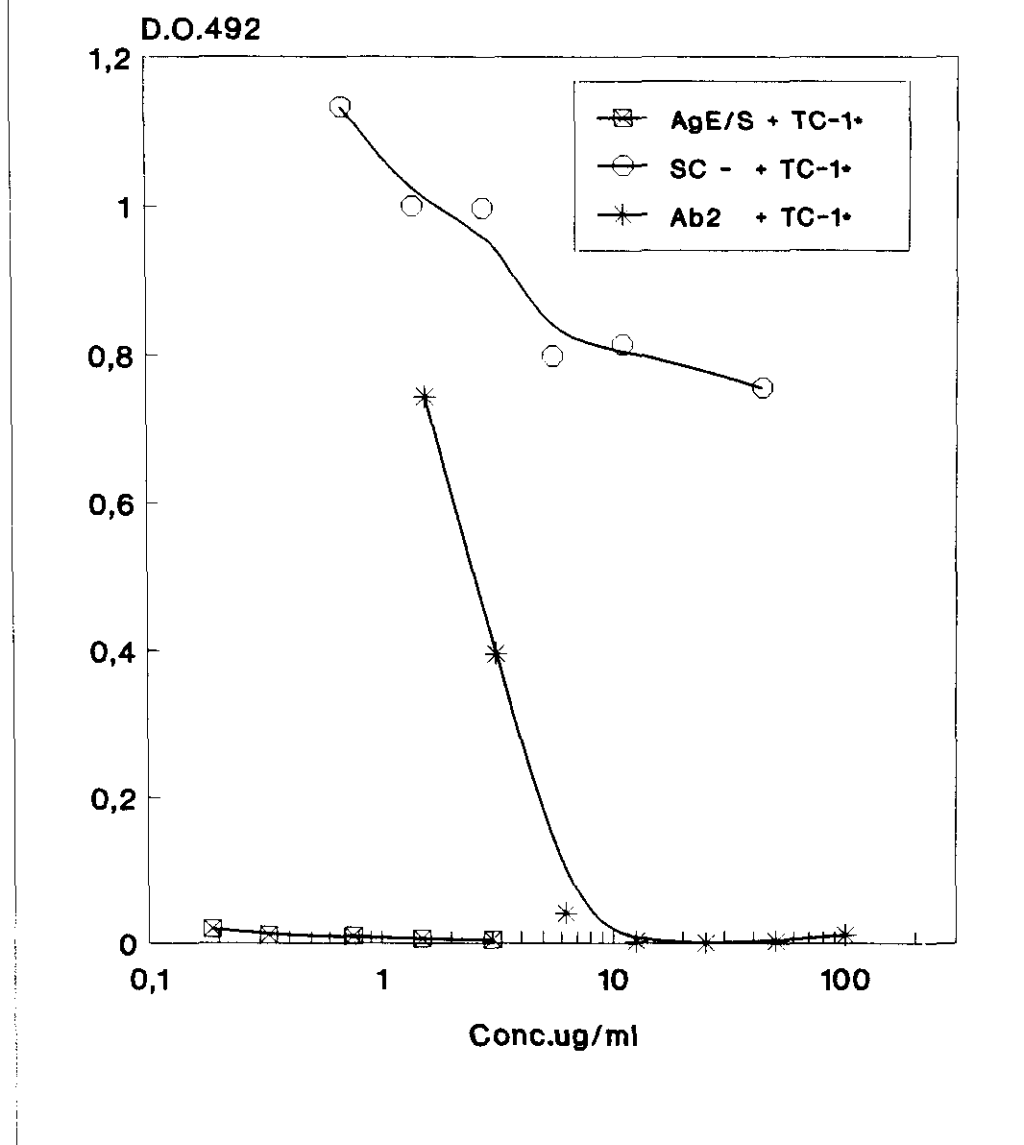
D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

% Inh. = Porcentaje de inhibición en la unión de TC-1 al antígeno E/S.

Dilución del conjugado = 1/1.500

FIGURA 80
E.L.I.S.A. de Inhibición



Tapizado = Antígeno excretor-secretor larvario a 0,12 ug/ml

TC-1* = Anticuerpo monoclonal TC-1 conjugado con biotina, a la dilución 1/12.000

Ag E/S = Antígeno excretor-secretor larvario

SC - = Suero de conejo negativo

Ab2 = Fracción IgG del suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado
del conejo 1, parcialmente purificado dos veces

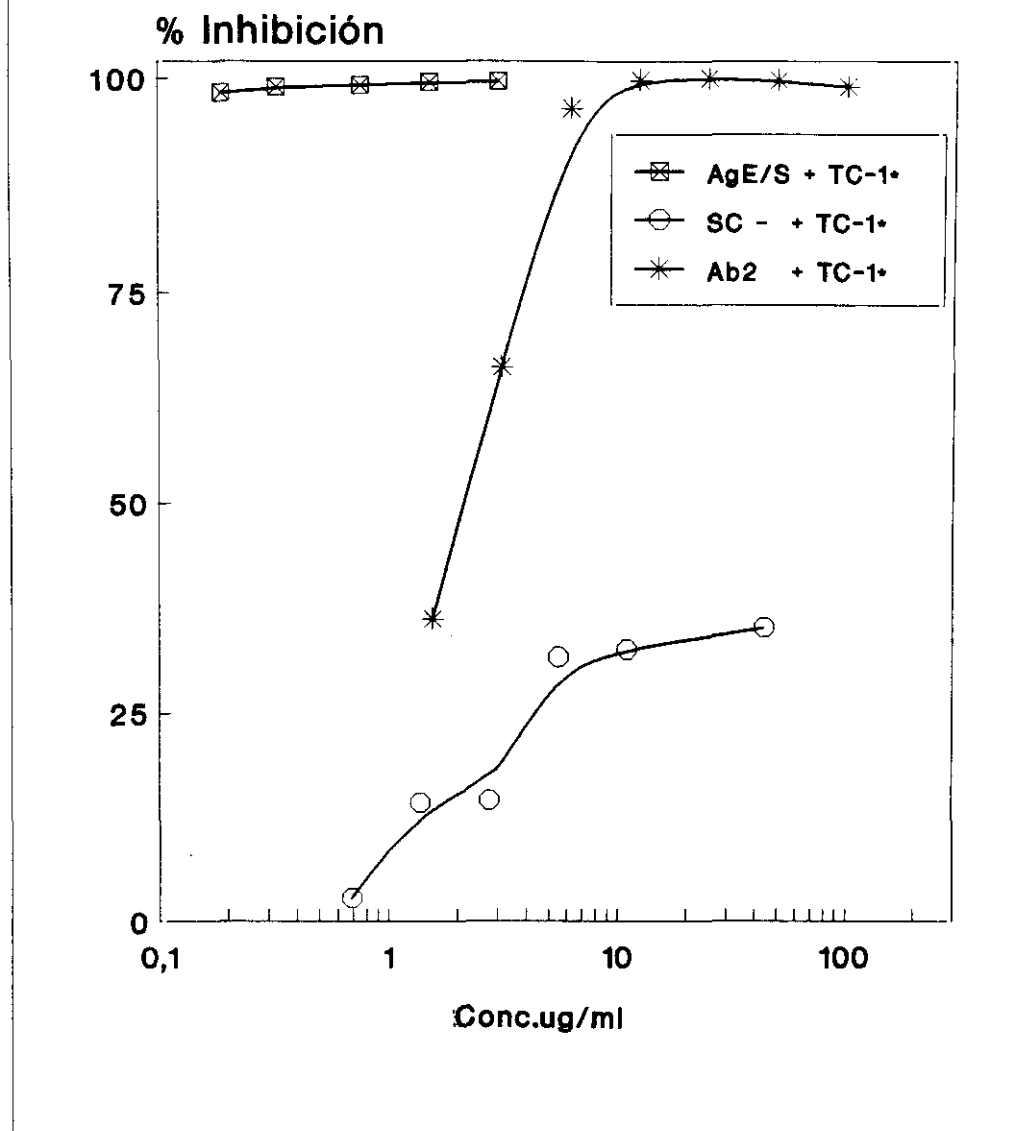
Muestras ensayadas :

Ag E/S + TC-1* = Ag E/S y TC-1* incubados previamente (Tabla CXXVIII)

SC - + TC-1* = SC - y TC-1* incubados previamente (Tabla CXXVII)

Ab2 + TC-1* = Ab2 y TC-1* incubados previamente (Tabla CXXIX)

FIGURA 81
E.L.I.S.A. de Inhibición



Tapizado = Antígeno excretor-secretor larvario a 0,12 ug/ml

TC-1* = Anticuerpo monoclonal TC-1 conjugado con biotina, a la dilución 1/12.000

Ag E/S = Antígeno excretor-secretor larvario

SC - = Suero de conejo negativo

Ab2 = Fracción IgG del suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado dos veces

Muestras ensayadas:

Ag E/S + TC-1* = Ag E/S y TC-1* incubados previamente (Tabla CXXVIII)

SC - + TC-1* = SC - y TC-1* incubados previamente (Tabla CXXVII)

Ab2 + TC-1* = Ab2 y TC-1* incubados previamente (Tabla CXXIX)

% Inhibición = Porcentaje de inhibición en la unión de TC-1 al Ag E/S

4.5.4.4.1.2.- Mediante microprecipitación larvaria

TABLA CXXX

Ensayo de inhibición de la microprecipitación

Anticuerpo	Horas	Concentración de anticuerpo ug/ml							
		350	175	87,5	43,7	21,8	10,8	5,46	2,7
TC-1	24	2	1	1	*	*	*	*	*
	48	3	3	3	2	2	2	2	2
TC-1/Ab2	24	2	1	*	*	*	*	*	0
	48	3	3	3	2	2	2	2	0
TC-2	24	1	*	*	*	*	*	*	*
	48	3	2	2	2	2	2	2	2
TC-2/Ab2	24	1	1	1	1	1	1	1	*
	48	3	3	3	3	2	2	2	2

Suero	Horas	1/Dilución							
		2	4	8	16	32	64	128	256
SR+	24	1	1	1	1	1	*	*	*
	48	3	2	3	2	1	1	1	0
SR+/Ab2	24	1	1	1	1	1	*	*	0
	48	3	2	2	1	1	1	1	0
SR-	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0
SR-/Ab2	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0

Controles de larvas con Ab2 o H.B.S.S. sólo, fueron negativos en ambas lecturas

TC-1 = Anticuerpo monoclonal TC-1

TC-2 = Anticuerpo monoclonal TC-2

Ab2 = Suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado una vez (dilución tras el paso por columna: 1/15), utilizado en el ensayo a la dilución 1/2

SR + = Suero murino control positivo

SR - = Suero murino control negativo

TC-1/Ab2 = TC-1 y Ab2 incubados previamente

TC-2/Ab2 = TC-2 y Ab2 incubados previamente

SR +/Ab2 = SR + y Ab2 incubados previamente

SR -/Ab2 = SR - y Ab2 incubados previamente

0 = Ninguna larva con precipitados

* = Pocas larvas con precipitados

1 = Larvas con precipitados, pero no sueltos en el medio

2 = Todas las larvas con precipitados, pocos sueltos en el medio

3 = Precipitados abundantes en larvas y medio

TABLA CXXXI
Ensayo de inhibición de la microprecipitación

Anticuerpo	Horas	Concentración de anticuerpo ug/ml									
		20	10	5	2,5	1,25	0,62	0,34	0,15	0,07	0,03
TC-1	24	1	1	1	1	1	1	*	*	0	0
	48	2	2	2	2	2	2	1	*	*	0
TC-1/Ab2	24	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	48	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0

Suero	Horas	1/Dilución						
		8	16	32	64	128	256	512
SR+	24	1	1	1	*	*	*	*
	48	2	1	1	1	*	*	*
SR+/Ab2	24	1	1	1	*	*	*	*
	48	2	1	1	1	*	*	*

Controles de larvas con Ab2 sólo o con H.B.S.S. sólo = "0" a las 24 y 48 horas

TC-1 = Anticuerpo monoclonal TC-1

Ab2 = Suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado una vez (dilución tras el paso por columna: 1/15), utilizado en el ensayo a la dilución 1/2

SR + = Suero murino control positivo

TC-1/Ab2 = TC-1 y Ab2 incubados previamente

SR +/Ab2 = SR+ y Ab2 incubados previamente

0 = Ninguna larva con precipitados

* = Pocas larvas con precipitados

1 = Larvas con precipitados, pero no sueltos en el medio

2 = Todas las larvas con precipitados, pocos sueltos en el medio



FOTO 11

Microprecipitado formado en el orificio oral de una larva de I. canis por reacción del antígeno excretor-secretor con el anticuerpo monoclonal TC-1.



FOTO 12

Ausencia de microprecipitado en el orificio oral de una larva de T. canis al enfrentarla al producto de la incubación previa entre el anticuerpo monoclonal TC-1 y el suero anti-idiotípico: **Inhibición de la microprecipitación**

4.5.4.4.2.- Inducción de la formación de anticuerpos anti-anti-idiotipo.
Ensayo de unión al antígeno excretor-secretor larvario

TABLA CXXXII

1/Dil. Ab3 M S	10	20	40	80	160	320	640	1.280
D.O.	0,724	0,612	0,479	0,361	0,300	0,216	0,137	0,053
Ag E/S	0,718	0,572	0,468	0,356	0,291	0,187	0,113	0,082
D.O.	0,169	0,119	0,082	0,069	0,062	0,053	0,046	0,043
B.S.A.	0,173	0,123	0,086	0,066	0,058	0,048	0,046	0,042
D.O. X-B.S.A.	0,550	0,471	0,389	0,291	0,235	0,151	0,079	0,025

TABLA CXXXIII

1/Dil. Ab3 1º S	10	20	40	80	160	320	640	1.280
D.O.	0,913	0,778	0,717	0,628	0,525	0,324	0,219	0,115
Ag E/S	0,820	0,845	0,753	0,518	0,391	0,161	0,091	0,072
D.O.	0,111	0,082	0,067	0,056	0,051	0,046	0,044	0,043
B.S.A.	0,102	0,098	0,068	0,055	0,050	0,045	0,044	0,042
D.O. X-B.S.A.	0,760	0,721	0,668	0,518	0,408	0,197	0,113	0,051

TABLA CXXXIV

1/Dil. SC -	10	20	40	80	160	320	640	1.280
D.O.	0,303	0,248	0,184	0,124	0,117	0,073	0,063	0,050
Ag E/S	0,330	0,245	0,185	0,126	0,098	0,075	0,059	0,051
D.O.	0,071	0,065	0,058	0,049	0,048	0,040	0,039	0,040
B.S.A.	0,072	0,060	0,056	0,047	0,047	0,045	0,042	0,041
D.O. X-B.S.A.	0,245	0,184	0,127	0,077	0,060	0,032	0,021	0,010

1/Dil. Ab3 M S = Inversa de la dilución de la muestra preliminar de suero anti-anti-idiotípico

1/Dil. Ab3 1º S = Inversa de la dilución del suero anti-anti-idiotípico procedente del primer sangrado

1/Dil. SC - = Inversa de la dilución de suero de conejo negativo

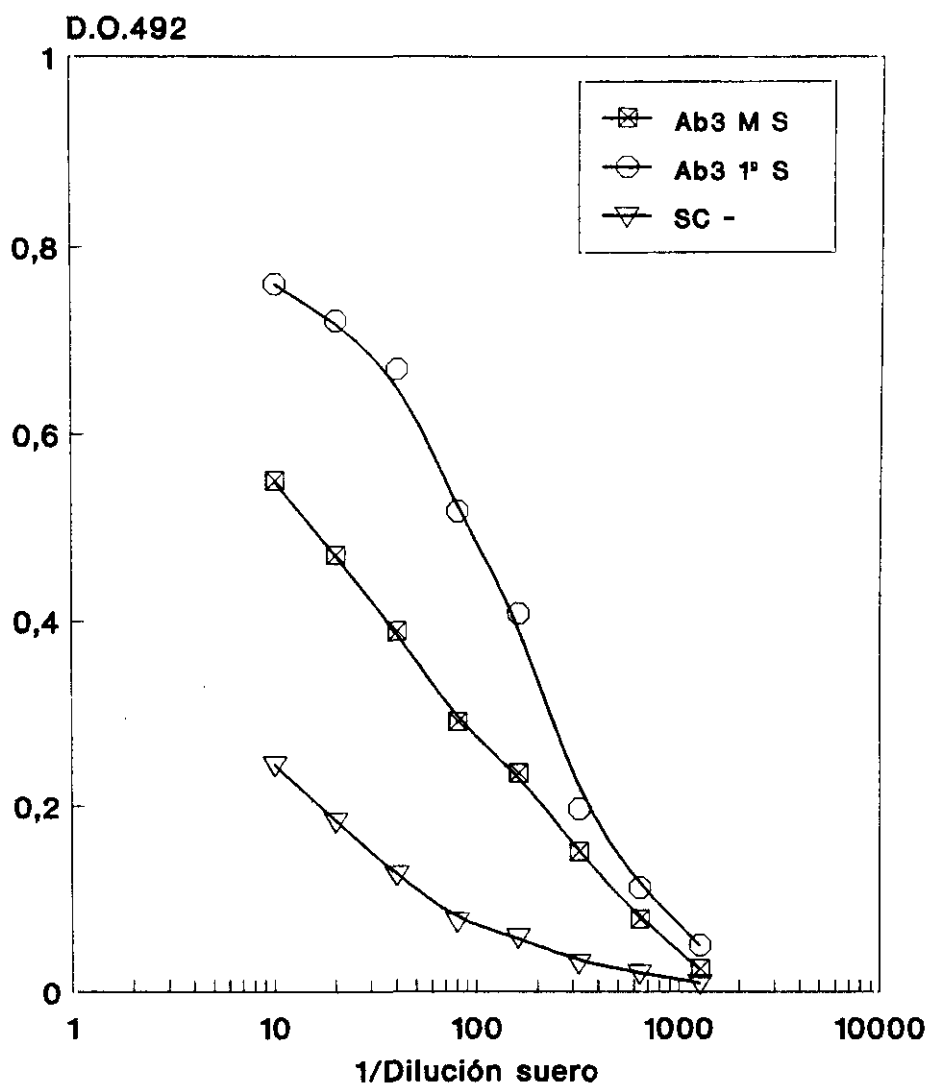
D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. X-B.S.A. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

Dilución del conjugado = 1/1.500

FIGURA 82



Ensayo de union Ab3 - AgE/S

Tapizado = Antígeno excretor-secretor larvario a 0,12 ug/ml

Ab3 = Suero anti-anti-idiotípico

Ag E/S = Antígeno excretor-secretor larvario

Muestras ensayadas:

Ab3 M S = Muestra preliminar de suero anti-anti-idiotípico (Tabla CXXXII)

Ab3 1º S = Suero anti-anti-idiotípico procedente del primer sangrado (Tabla CXXXIII)

SC - = Suero de conejo negativo (Tabla CXXXIV)

4.5.4.4.3. - Posible utilización de los anticuerpos anti-idiotipo como réplica

idiotipica del antígeno excretor-secretor larvario: Aplicación en

la detección de anticuerpos específicos en suero murino por E.L.I.S.A.

4.5.4.4.3.1. Ensayos directos

S.M.	Suero + nº 1			Suero + nº 2			Suero + nº 3			Suero -			IC-1
1/Dil.	50	100	150	50	100	150	50	100	150	50	100	150	10 ug/ml
D.O.	0,616	0,484	0,522	0,908	0,850	0,765	0,891	0,911	0,827	0,290	0,217	0,148	0,779
Ag E/S	0,661	0,561	0,633	0,967	0,871	0,854	0,968	0,930	0,855	0,333	0,238	0,210	0,825
D.O.	0,165	0,160	0,168	0,155	0,139	0,135	0,178	0,180	0,141	0,143	0,115	0,124	0,129
B.S.A.	0,176	0,134	0,151	0,140	0,115	0,116	0,185	0,161	0,138	0,102	0,095	0,098	0,086
D.O. X-B.S.A.	0,468	0,375	0,418	0,790	0,733	0,684	0,748	0,750	0,702	0,189	0,172	0,068	0,695
I D.O.p D.O.t	2,47	2,18	6,14	4,17	4,26	10,05	3,95	4,36	10,32	-----	-----	-----	-----

S.M. = Sueros murinos de la cepa BALB/c

1/Dil. = Inversa de la dilución del suero ensayado

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. X-B.S.A. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O.problema/D.O.testigo

Suero + nº 1 = Suero procedente de la 6ª semana p.i. con 4.000 huevos embrionados de T. canis en pauta múltiple (1.000 huevos/semana)

Suero + nº 2 = Suero procedente de la 9ª semana p.i. con 1.000 huevos embrionados de T. canis

Suero + nº 3 = Suero procedente de la 7ª semana p.i. con 1.000 huevos embrionados de T. canis

Suero - = Suero control negativo

IC-1 = Anticuerpo monoclonal TC-1

Dilución del conjugado = 1/1.000

TABLA CXXXVI

S.M.	Suero + nº 1			Suero + nº 2			Suero + nº 3			Suero -			TC-1
1/Dil.	50	100	150	50	100	150	50	100	150	50	100	150	10 ug/ml
D.O.	0,546	0,383	0,401	0,565	0,413	0,335	0,647	0,470	0,416	0,347	0,261	0,231	0,836
Ab2 (10)	0,594	0,427	0,488	0,593	0,448	0,363	0,677	0,520	0,435	0,362	0,282	0,264	0,806
D.O.	0,156	0,170	0,166	0,167	0,159	0,156	0,187	0,160	0,150	0,155	0,133	0,130	0,160
B.S.A.	0,158	0,138	0,152	0,163	0,155	0,132	0,167	0,171	0,161	0,104	0,104	0,098	0,112
D.O. X-B.S.A.	0,413	0,251	0,285	0,414	0,273	0,205	0,485	0,330	0,270	0,225	0,153	0,133	0,685
I D.O.p D.O.t	1,83	1,64	2,14	1,84	1,78	1,54	2,15	2,15	2,03	-----	-----	-----	-----

S.M. = Sueros murinos de la cepa BALB/c

1/Dil. = Inversa de la dilución del suero ensayado

Ab2 = Fracción IgG del suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado dos veces

D.O. Ab2 (10) = Densidad óptica frente a Ab2 a 10 ug/ml

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. X-B.S.A. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O. problema/D.O. testigo

Suero + nº 1 = Suero procedente de la 6ª semana p.i. con 4.000 huevos embrionados de T. canis en pauta múltiple (1.000 huevos/semana)

Suero + nº 2 = Suero procedente de la 9ª semana p.i. con 1.000 huevos embrionados de T. canis

Suero + nº 3 = Suero procedente de la 7ª semana p.i. con 1.000 huevos embrionados de T. canis

Suero - = Suero control negativo

TC-1 = Anticuerpo monoclonal TC-1. Dilución del conjugado = 1/500

TABLA CXXXVII

S.M.	Suero + nº 3			Suero + nº 4			Suero -			TC-1
1/Dil.	50	100	150	50	100	150	50	100	150	10 ug/ml
D.O.	0,667	0,572	0,581	0,752	0,679	0,651	0,132	0,103	0,104	0,613
Ag E/S	0,654	0,632	0,590	0,742	0,706	0,626	0,171	0,152	0,145	0,638
D.O.	0,138	0,137	0,128	0,147	0,136	0,124	0,115	0,112	0,113	0,136
B.S.A.	0,106	0,102	0,112	0,117	0,103	0,096	0,089	0,079	0,080	0,101
D.O.	0,538	0,483	0,465	0,615	0,573	0,528	0,049	0,032	0,028	0,507
\bar{X} -B.S.A.										
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	10,97	15,09	16,60	12,55	17,90	18,85	-----	-----	-----	-----

TABLA CXXXVIII

S.M.	Suero + nº 3			Suero + nº 4			Suero -		
1/Dil.	50	100	150	50	100	150	50	100	150
D.O.	0,528	0,468	0,433	0,572	0,453	0,389	0,361	0,299	0,277
IgG C.	0,564	0,507	0,461	0,609	0,500	0,429	0,398	0,339	0,311
D.O.	0,137	0,142	0,146	0,164	0,140	0,124	0,116	0,113	0,110
B.S.A.	0,137	0,138	0,143	0,147	0,132	0,116	0,095	0,102	0,094
D.O.	0,409	0,347	0,303	0,435	0,340	0,289	0,274	0,212	0,192
\bar{X} -B.S.A.									
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	1,49	1,63	1,57	1,58	1,60	1,50	-----	-----	-----

S.M. = Sueros murinos de la cepa BALB/c

1/Dil. = Inversa de la dilución de los sueros ensayados

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$ = D.O.problema/D.O.testigo

Suero + nº 3 = Suero procedente de la 7ª semana p.i. con 1.000 huevos embrionados (h.e.) de T. canis

Suero + nº 4 = Suero procedente de la 6ª semana p.i. con 1.000 h.e. de T. canis

Suero - = Suero control negativo

TC-1 = Anticuerpo monoclonal TC-1

IgG C = Inmunoglobulinas G de conejo procedente de suero negativo

D.O. IgG C = Densidad óptica frente a IgG C a 10 ug/ml

Dilución del conjugado = 1/1.000 (Tabla CXXXVII) y 1/500 (Tabla CXXXVIII)

TABLA CXXXIX

S.M.	Suero + nº 3			Suero + nº 4			Suero -			TC-1
1/Dil.	50	100	150	50	100	150	50	100	150	10 ug/ml
D.O.	0,444	0,380	0,289	0,534	0,335	0,230	0,233	0,190	0,161	0,758
Ab2 (10)	0,453	0,436	0,326	0,545	0,344	0,255	0,274	0,220	0,198	0,736
D.O.	0,153	0,170	0,132	0,159	0,159	0,135	0,119	0,120	0,115	0,149
B.S.A.	0,123	0,141	0,136	0,131	0,128	0,099	0,101	0,093	0,083	0,098
D.O. X-B.S.A.	0,310	0,253	0,173	0,394	0,196	0,125	0,143	0,099	0,080	0,624
I D.O.p D.O.t	2,16	2,55	2,16	2,75	1,97	1,56	-----	-----	-----	-----

TABLA CXL

S.M.	Suero + nº 3			Suero + nº 4			Suero -		
1/Dil.	50	100	150	50	100	150	50	100	150
D.O.	0,457	0,368	0,360	0,518	0,323	0,234	0,238	0,188	0,161
Ab2 (20)	0,485	0,407	0,378	0,548	0,367	0,275	0,289	0,229	0,216
D.O.	0,149	0,168	0,145	0,161	0,162	0,127	0,132	0,124	0,115
B.S.A.	0,143	0,146	0,146	0,146	0,150	0,118	0,112	0,107	0,103
D.O. X-B.S.A.	0,325	0,230	0,224	0,380	0,189	0,132	0,141	0,093	0,079
I D.O.p D.O.t	2,30	2,47	2,83	2,69	2,03	1,67	-----	-----	-----

S.M. = Sueros murinos de la cepa BALB/c

1/Dil. = Inversa de la dilución de los sueros ensayados

Ab2 = Fracción IgG del suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado dos veces

D.O. Ab2 (10) = Densidad óptica frente a Ab2 a 10 ug/ml

D.O. Ab2 (20) = Densidad óptica frente a Ab2 a 20 ug/ml

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O.X-B.S.A. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

I D.O.p/D.O.t = D.O.problema/D.O.testigo

Suero + nº 3 = Suero procedente de la 7ª semana p.i. con 1.000 huevos embrionados (h.e.) de T. canis

Suero + nº 4 = Suero procedente de la 6ª semana p.i. con 1.000 h.e. de T. canis

Suero - = Suero control negativo

TC-1 = Anticuerpo monoclonal TC-1

Dilución del conjugado = 1/500

4.5.4.4.3.2.- Ensayos de inhibición

a) Titulación del anticuerpo monoclonal TC-1 conjugado con biotina frente al suero anti-idiotípico

TABLA CXLI

1/Dil. TC-1*	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000	32.000
D.O.	0,874	1,017	1,070	0,907	0,653	0,464
Ab2 250	1,194	1,288	1,110	0,871	0,679	0,442
D.O.	1,407	1,258	1,062	0,869	0,680	0,434
Ab2 500	1,457	1,240	1,048	0,875	0,668	0,439
D.O.	1,169	1,229	1,055	0,832	0,618	0,423
Ab2 1000	0,981	1,164	1,050	0,838	0,609	0,414
D.O.	0,058	0,066	0,059	0,055	0,047	0,038
B.S.A.	0,060	0,070	0,056	0,050	0,041	0,043
D.O.	0,975	1,084	1,033	0,837	0,622	0,413
\bar{X} -B.S.A. Ab2 250						
D.O.	1,373	1,181	0,998	0,820	0,630	0,396
\bar{X} -B.S.A. Ab2 500						
D.O.	1,016	1,128	0,995	0,783	0,569	0,378
\bar{X} -B.S.A. Ab2 1000						

1/Dil. TC-1* = Inversa de la dilución del anticuerpo monoclonal TC-1 conjugado con biotina

Ab2 = Suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1 parcialmente purificado una vez (dilución tras el paso por columna = 1:15)

D.O. Ab2 250 = Densidad óptica frente a Ab2 a la dilución 1/250

D.O. Ab2 500 = Densidad óptica frente a Ab2 a la dilución 1/500

D.O. Ab2 1.000 = Densidad óptica frente a Ab2 a la dilución 1/1.000

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. Ab2 250 = Valores medios de D.O. Ab2 250 una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. Ab2 500 = Valores medios de D.O. Ab2 500 una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. Ab2 1.000 = Valores medios de D.O. Ab2 1.000 una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

Dilución del conjugado = 1/1.000

TABLA CXLII

1/Dil. S.M. ↓	D.O. Ab2 S - nº 1	D.O. Ab2 S - nº 2	D.O. Ab2 S + nº 3	D.O. Ab2 S + nº 2	D.O. B.S.A.	\bar{X} D.O. S - nº 1	\bar{X} D.O. S - nº 2	\bar{X} D.O. S + nº 3	\bar{X} D.O. S + nº 2	% Inh. S+3/S-1	% Inh. S+2/S-1	% Inh. S-2/S-1	% Inh. S+3/S-2	% Inh. S+2/S-2
25	0,448	0,449	0,310	0,288	0,053	0,408	0,400	0,244	0,235	40,20	42,41	1,97	39,00	41,25
	0,474	0,457	0,284	0,288	0,054									
50	0,519	0,509	0,327	0,339	0,055	0,471	0,440	0,267	0,256	43,32	45,65	6,59	39,32	41,82
	0,534	0,482	0,318	0,284	0,056									
100	0,616	0,576	0,364	0,383	0,051	0,558	0,498	0,309	0,292	44,63	47,68	10,76	37,96	41,37
	0,605	0,524	0,358	0,306	0,053									
200	0,700	0,644	0,411	0,448	0,057	0,626	0,570	0,358	0,338	42,82	46,01	8,95	37,20	40,71
	0,667	0,611	0,420	0,342	0,057									
400	0,730	0,700	0,470	0,485	0,056	0,667	0,587	0,416	0,392	37,64	41,23	12,00	29,14	33,22
	0,723	0,592	0,480	0,417	0,063									
800	0,737	0,667	0,519	0,497	0,061	0,648	0,591	0,464	0,409	28,40	36,89	8,80	21,49	30,80
	0,681	0,637	0,531	0,444	0,061									

C. TC-1	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	P.B.S.
D.O.	0,147	0,142	0,139	0,135	0,135	0,142	0,494
Ab2	0,151	0,144	0,139	0,138	0,138	0,147	0,524
D.O.	0,067	0,065	0,067	0,066	0,064	0,065	0,058
B.S.A.	0,061	0,062	0,060	0,063	0,054	0,059	0,041
D.O.	0,085	0,080	0,076	0,072	0,077	0,082	0,460
X-B.S.A.							
% Inh.	81,53	82,61	83,48	84,35	83,27	82,18	----
P.B.S.							

1/Dil. S.M. = Inversa de la dilución del suero murino ensayado (cepa BALB/c)

Ab2 = Suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado una vez, (dilución tras el paso por columna = 1:15), utilizado en el ensayo a la dilución 1/500.

D.O. Ab2 = Densidad óptica frente a Ab2

S - nº 1 = Suero negativo nº 1

S - nº 2 = Suero negativo nº 2

S + nº 3 = Suero procedente de la 7ª semana p.i. con 1.000 huevos embrionados de T. canis

S + nº 2 = Suero procedente de la 9ª semana p.i. con 1.000 huevos embrionados de T. canis

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

\bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

% Inh. = Porcentaje de inhibición en la unión del anticuerpo monoclonal TC-1 a Ab2

% Inh. S+3/S-1 = % Inh. del S + nº 3 respecto al S - nº 1

% Inh. S+2/S-1 = % Inh. del S + nº 2 respecto al S - nº 1

% Inh. S-2/S-1 = % Inh. del S - nº 2 respecto al S - nº 1

% Inh. S+3/S-2 = % Inh. del S + nº 3 respecto al S - nº 2

% Inh. S+2/S-2 = % Inh. del S + nº 2 respecto al S - nº 2

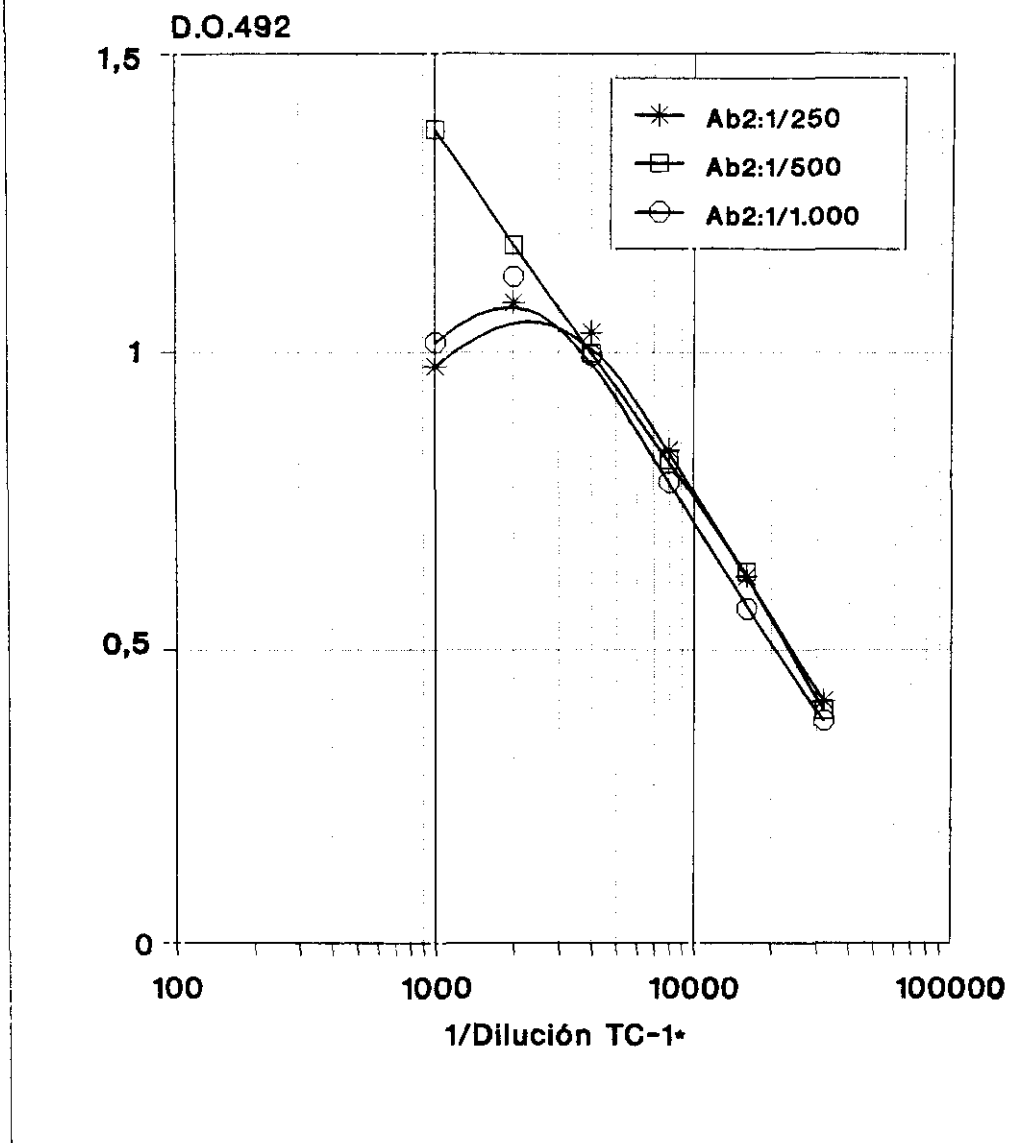
C. TC-1 = Concentración del anticuerpo monoclonal TC-1 en ug/ml

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

% Inh. P.B.S. = Porcentaje de inhibición en la unión del anticuerpo monoclonal TC-1 a Ab2, respecto al P.B.S.

Dilución del conjugado = 1/1.000

FIGURA 83
Titulación TC-1 conjugado con biotina



Ab2 = Suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado una vez (dilución tras el paso por columna = 1:15)

Ab2:1/250 = Ab2 a la dilución 1/250

Ab2:1/500 = Ab2 a la dilución 1/500

Ab2:1/1.000 = Ab2 a la dilución 1/1.000

1/Dilución TC-1* = Inversa de la dilución del anticuerpo monoclonal TC-1 conjugado con biotina (Tabla CXLI)

FIGURA 84
Ensayo de Inhibición

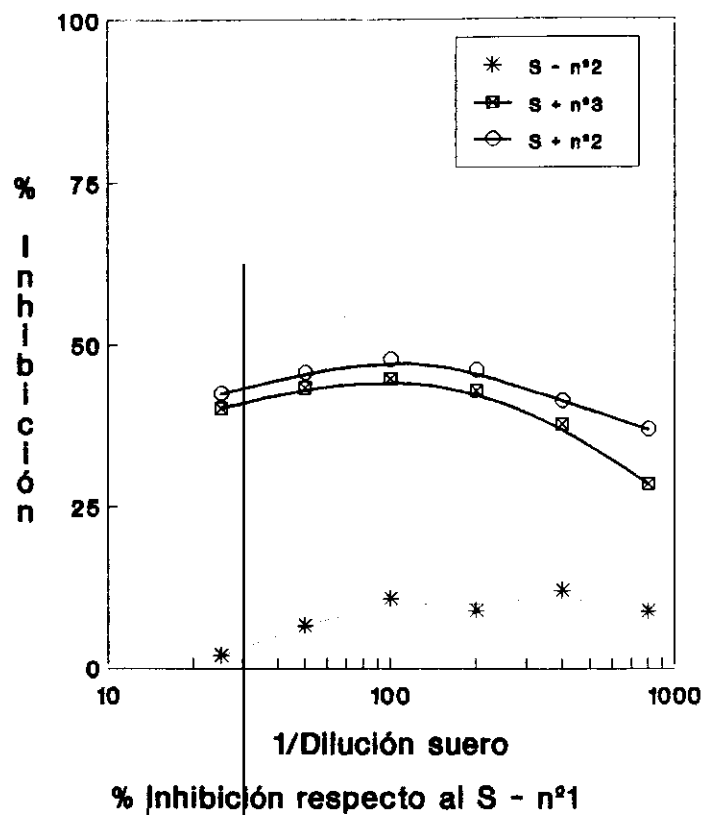
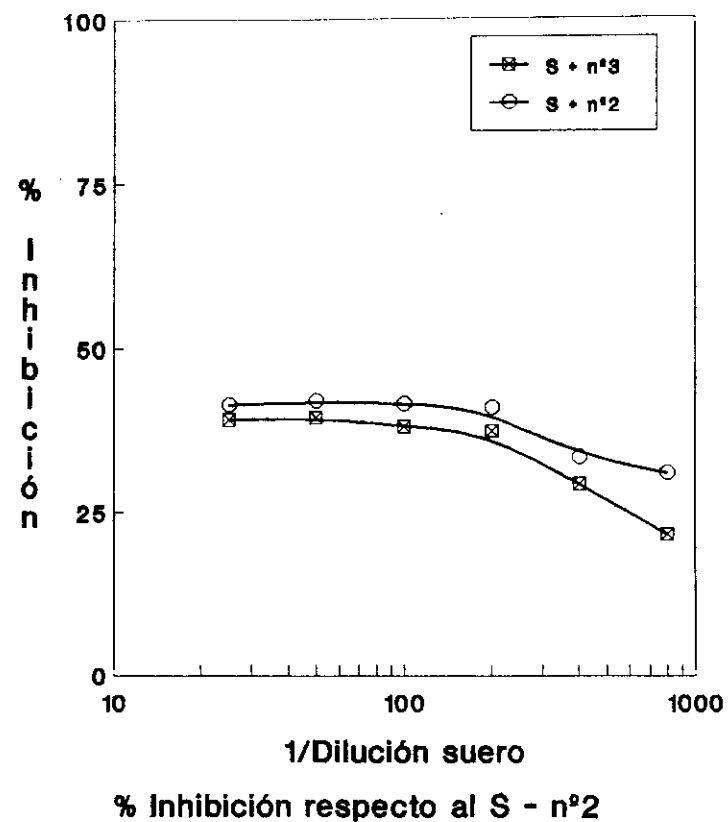


FIGURA 85
Ensayo de Inhibición



% Inhibición = Porcentaje de inhibición en la unión del anticuerpo monoclonal TC-1 a Ab2

Suero - n°1 y Suero - n°2 = Sueros negativos 1 y 2.

Suero + n°3 = Suero procedente de la 7ª semana p.i. con 1.000 huevos embrionados de T.canis

Suero + n°2 = Suero procedente de la 9ª semana p.i. con 1.000 huevos embrionados de T. canis (Tabla CXLII)

TABLA CXLI: Inmunoglobulinas Ig M

P p.i.	0	1 s	2 s	3 s	4 s	5 s	6 s	7 s	9 m	10 m	12 m
D.O.	0,060	0,276	0,456	0,372	0,396	0,452	0,392	0,421	0,533	0,583	0,544
Ag E/S	0,057	0,226	0,505	0,422	0,395	0,433	0,425	0,437	0,580	0,574	0,455
D.O.	0,016	0,031	0,043	0,040	0,040	0,040	0,024	0,024	0,021	0,032	0,039
B.S.A.	0,014	0,034	0,045	0,038	0,039	0,048	0,022	0,026	0,024	0,025	0,040
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,043	0,219	0,436	0,358	0,356	0,398	0,385	0,404	0,534	0,550	0,460
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	-----	5,09	10,13	8,32	8,27	9,25	8,95	9,39	12,41	12,79	10,69

TABLA CXLII: Inmunoglobulinas Ig G

P p.i.	0	1 s	2 s	3 s	4 s	5 s	6 s	7 s	9 m	10 m	12 m
D.O.	0,084	0,140	0,267	0,299	0,434	0,589	0,499	0,528	0,728	0,825	0,770
Ag E/S	0,090	0,207	0,384	0,414	0,515	0,628	0,444	0,523	0,731	0,761	0,773
D.O.	0,038	0,068	0,137	0,089	0,076	0,107	0,040	0,028	0,018	0,021	0,019
B.S.A.	0,044	0,052	0,092	0,061	0,061	0,083	0,042	0,028	0,024	0,023	0,019
D.O. \bar{X} -B.S.A.	0,046	0,113	0,211	0,281	0,406	0,513	0,430	0,497	0,708	0,771	0,752
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$	----	2,45	4,58	6,10	8,82	11,15	9,34	10,80	15,39	16,76	16,34

P p.i. = Periodo postinoculación (s = semanas, m = meses)

D.O. Ag E/S = Densidad óptica frente al antígeno excretor-secretor larvario

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O. \bar{X} -B.S.A. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

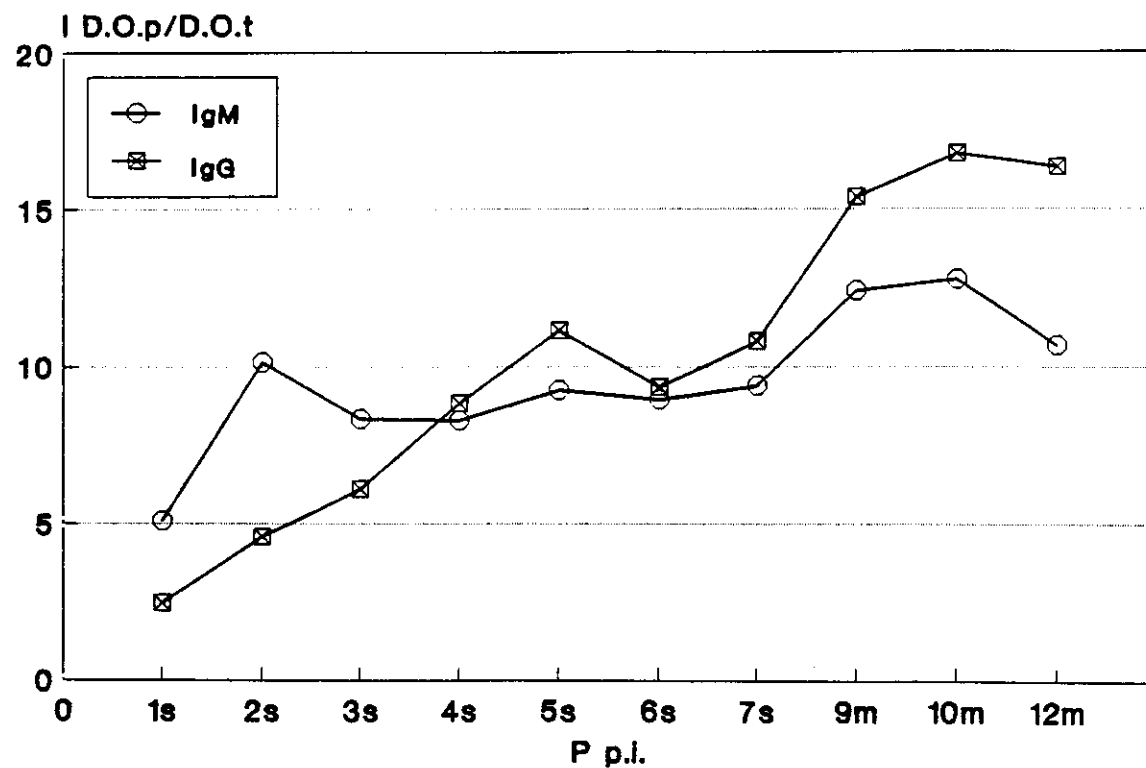
I $\frac{D.O.p}{D.O.t}$ = D.O.problema/D.O.testigo

Dilución del conjugado (anti-inmunoglobulinas M y anti-inmunoglobulinas G) = 1/1.000

c) Dinámica de aparición de anticuerpos específicos en la cepa murina BALB/c tras la inoculación con 1.000 huevos embrionados de *T. canis*

c.1) Anticuerpos frente al antígeno excretor-secretor larvario completo (Ensayos directos)

FIGURA 86
E.L.I.S.A. frente a Ag E/S



Dinámica de anticuerpos en BALB/c

I D.O.p/D.O.t = Densidad óptica problema/Densidad óptica testigo

P p.i. = Periodo postinoculación (s = semanas, m = meses)

TABLA CXLV

P. p.i.	0	1 s	2 s	3 s	4 s	5 s	6 s	7 s	9 m	10 m	12 m
D.O.	0,602	0,580	0,602	0,578	0,521	0,450	0,423	0,403	0,375	0,373	0,378
Ab2	0,631	0,579	0,576	0,572	0,508	0,464	0,412	0,392	0,356	0,361	0,370
D.O.	0,055	0,043	0,045	0,045	0,047	0,049	0,044	0,048	0,048	0,047	0,049
B.S.A.	0,045	0,048	0,051	0,045	0,046	0,047	0,049	0,045	0,043	0,043	0,041
D.O. X-B.S.A.	0,566	0,534	0,541	0,530	0,468	0,409	0,371	0,351	0,320	0,322	0,329
% Inh.	-----	5,66	4,42	6,37	17,32	27,74	34,46	37,99	43,47	43,11	41,88

TABLA CXLVI

P. p.i.	0	1 s	2 s	3 s	4 s	5 s	6 s	7 s	9 m	10 m	12 m
D.O.	0,818	0,740	0,762	0,725	0,645	0,587	0,568	0,506	0,472	0,472	0,468
Ab2	0,846	0,798	0,844	0,777	0,692	0,615	0,510	0,538	0,476	0,485	0,474
D.O.	0,040	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,038	0,039	0,040	0,039	0,039
B.S.A.	0,039	0,040	0,040	0,039	0,041	0,039	0,040	0,040	0,039	0,040	0,041
D.O. X-B.S.A.	0,793	0,730	0,764	0,712	0,628	0,562	0,500	0,483	0,435	0,439	0,431
% Inh.	-----	7,95	3,66	10,22	20,81	29,13	36,95	39,10	45,15	44,65	45,65

P. p.i. = Periodo postinoculación (s = semanas, m = meses)

Ab2 = Suero anti-idiotípico procedente del primer sangrado del conejo 1, parcialmente purificado una vez (dilución tras el paso por columna = 1:15), utilizado en el ensayo a la dilución 1/500

D.O. Ab2 = Densidad óptica frente a Ab2

D.O. B.S.A. = Densidad óptica frente a la B.S.A.

D.O.X-B.S.A. = Valores medios de D.O. una vez restada la correspondiente a la B.S.A.

% Inh. = Porcentaje de inhibición en la unión del anticuerpo monoclonal TC-1 a Ab2

Dilución del conjugado = 1/100

FIGURA 87
Ensayo de Inhibición

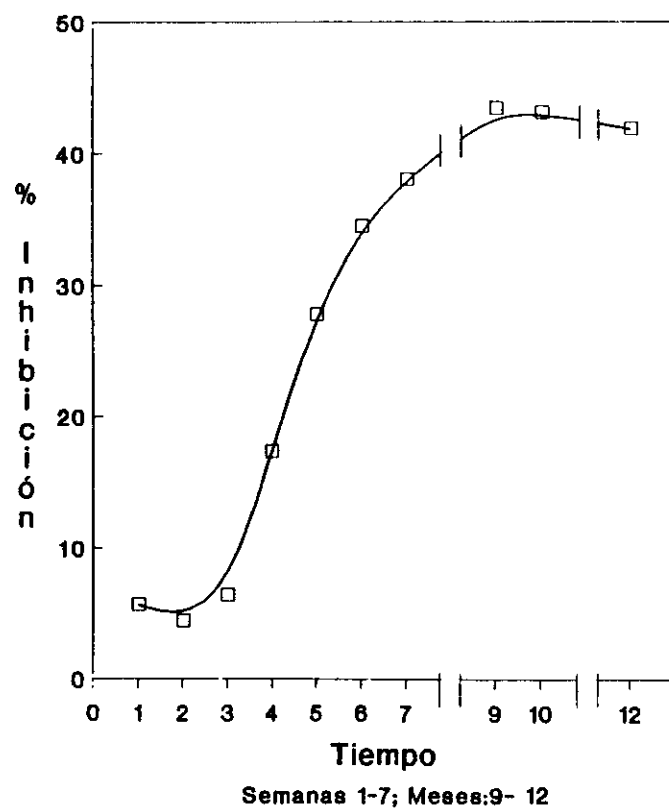
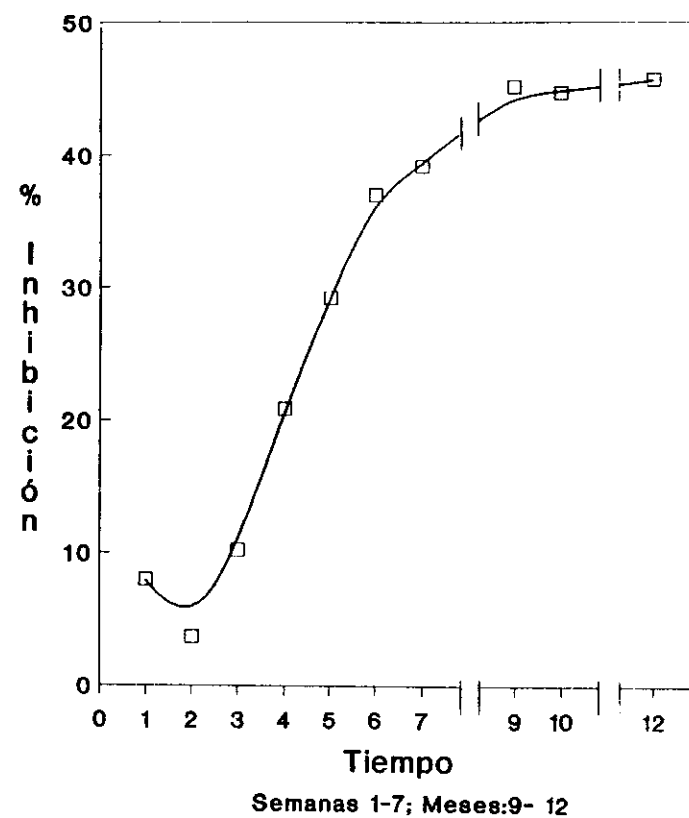


FIGURA 88
Ensayo de Inhibición



Dinámica de anticuerpos en BALB/c

DISCUSSION

5.- DISCUSION

5.1.- ESTUDIO DE LA MIGRACION LARVARIA DE T.canis

5.1.1.- ESTUDIO EN HIGADO, PULMONES, VISCERAS, PATAS TRASERAS, CANAL Y CEREBRO

Al estudiar la dinámica de la migración larvaria de T. canis en el modelo murino, en las cepas BALB/c y C57BL/10, expresamos los resultados obtenidos como porcentajes de recuperación larvaria en cada órgano, respecto al total de larvas recuperadas, tal y como se refleja a continuación.

En la cepa BALB/c se observaron los siguientes máximos en los porcentajes de recuperación: durante los días dos, tres, y cuatro p.i., el máximo larvario apareció en hígado, con unos valores del 93,55%; 58,54% y 42,27% respectivamente. El quinto día p.i. la mayoría de las larvas habían alcanzado ya la canal (50%), aumentando su número durante los siguientes dos días estudiados (el séptimo día p.i. el máximo fue del 57,93% y el décimo día p.i. del 52,28%), para llegar a un máximo el día 15 p.i. del 63,05% de larvas recuperadas en esta localización. A partir de este día el número de larvas en la canal fue descendiendo ligeramente a lo largo de la experiencia, manteniéndose no obstante una carga parasitaria considerable en este tejido al final de la misma. El día 21 p.i. el máximo larvario seguía encontrándose en la canal con un 53,72%, y a los 35 días p.i., casi la totalidad de las larvas aparecieron repartidas entre canal y cerebro, con un 45,16% y 47,92% respectivamente. Esta proporción siguió manteniéndose dos semanas después, día 49 p.i. (49,80% y 44,18% respectivamente), para terminar el día 63 p.i., con un máximo cerebral del 51,78%, quedando todavía en la canal el 37,82% de las larvas. Es decir, al final permanecieron repartidas entre canal y cerebro, con predominio de este último.

En la cepa C57BL/10, el patrón migratorio mostró diferencias en el número de larvas y en la cronología de las distintas localizaciones: en los días dos, tres y cuatro p.i., los máximos porcentajes aparecieron también en hígado, (98,87%; 89,57% y 86,99%). El quinto día p.i., la mayor cantidad de larvas se encontraba en la canal (36,42%) al igual que en la cepa

BALB/c (50%), pero en este modelo seguía habiendo un 35,32% de larvas en hígado. A partir del séptimo día p.i., se incrementó el número de larvas recuperadas en la canal (58,47%), hasta llegar a los 15 días p.i. a un máximo del 69,54% en este tejido. Una semana más tarde, el día 21 p.i., el porcentaje máximo seguía encontrándose en la canal, con un valor prácticamente invariable del 68,79%. Desde este día, el número de larvas en la canal comenzó a descender manteniéndose constante durante dos semanas (el día 35 p.i. el máximo fue del 48,36% y el día 49 p.i. del 48,18%), para disminuir ligeramente al final de la experiencia, día 63 p.i., con un 39,84%. Durante las dos últimas semanas se observó un comportamiento totalmente distinto en la distribución, con una disminución del porcentaje cerebral y un aumento del porcentaje larvario hepático (31,92% desciende a 13,41%, y 7,17% asciende a 35,48% respectivamente).

Comparando estos resultados, observamos una migración larvaria más lenta en C57BL/10 que en BALB/c. Durante los tres primeros días estudiados, dos, tres, y cuatro p.i., el porcentaje de larvas en hígado en C57BL/10 fue superior al de BALB/c. A los cinco días p.i., aunque el máximo en ambas cepas se encontraba en la canal, en C57BL/10 seguía habiendo un 35,32% de larvas en hígado, mientras que en BALB/c se detectó un porcentaje considerablemente menor (15,64%). El máximo del estudio se alcanzó al mismo tiempo para las dos cepas, a los 15 días p.i., y en la misma localización (la canal), pero mientras en BALB/c las larvas fueron repartiéndose entre canal y cerebro, acumulándose finalmente en este último, en C57BL/10 el porcentaje en la canal permaneció siempre por encima del obtenido en cerebro, y al finalizar la experiencia se observó un retorno larvario desde el cerebro hasta el hígado.

Al tratar de comparar la dinámica de migración larvaria mediante la observación de los máximos porcentajes de recuperación, hay que tener en cuenta que los protocolos experimentales utilizados por los distintos autores no son homogéneos, por lo que realizaremos la discusión matizando coincidencias y discordancias, fundamentalmente en función de la cepa utilizada.

MACCHIONI y MARCONCINI (1.967) utilizando "ratón blanco" y estudiando hígado, pulmones, canal y cerebro, observan el día dos y tres p.i., el máximo porcentaje de larvas en hígado, con un 97,26% y un 78,58%

respectivamente, y el décimo día p.i. detectan una migración mayoritaria a la canal (70,75%). Esta dinámica coincide con la observada por nosotros en cuanto al momento de mayor acumulación hepática, aunque el máximo en la canal en nuestro caso se retrasó cinco días en el tiempo. Estos porcentajes se asemejan más a los obtenidos para la cepa C57BL/10, que curiosamente no son "ratones blancos", que a los obtenidos en BALB/c.

LEE y col. (1.976) obtienen, en "ratones albinos", los días uno, dos, tres y cuatro p.i., el mayor porcentaje de larvas en hígado (94,59%; 90,90%; 51,80% y 30,48% respectivamente); esto es similar a lo obtenido en nuestro estudio, y prácticamente concordante con los resultados en BALB/c. Los días siguientes, y hasta el final de la experiencia (octava semana), el máximo porcentaje de recuperación aparece en la canal, de modo semejante a nuestros datos. En su caso la cantidad de larvas en esta localización supera siempre a la de cerebro, lo que supone un comportamiento distinto al observado por nosotros, pues en la quinta y séptima semana p.i. encontramos que la población larvaria aparece repartida entre ambos órganos, y al finalizar nuestra experiencia, el porcentaje cerebral fue superior. En C57BL/10, en cambio, el comportamiento que observamos es similar al de estos autores, pues las larvas se fueron acumulando a lo largo del tiempo en la canal, siempre con predominio sobre cerebro.

Con las cepas Canberra y C57BL, DUNSMORE y col. (1.983) observan el día dos p.i., los máximos porcentajes de larvas en hígado, 76,60% y 88,87% respectivamente, frente a los 93,55% y 98,87% en BALB/c y C57BL/10 encontrados por nosotros. A los cuatro días p.i., encuentran la mayor cantidad de larvas en pulmones, para ambas cepas (38,19% en Canberra y 41,82% en C57BL), lo cual no concuerda con nuestros resultados, ya que en este momento, seguíamos detectándolas mayoritariamente en hígado. En este día, tan sólo encontramos un 12,69% en BALB/c y un 7,21% en C57BL/10, porcentajes muy inferiores a los que citan estos autores, lo que indica una distinta susceptibilidad de las cepas utilizadas.

El estudio de la distribución intraorgánica en función del tiempo, indica que, tanto en BALB/c como en C57BL/10, el máximo en hígado se produce el segundo día p.i., con los porcentajes citados anteriormente.

El mismo resultado lo obtienen MACCHIONI y MARCONCINI (1.967) y ABDEL-HAMMED (1.984) con porcentajes similares a los nuestros (97,26% y 97,6%) sin especificar cepa los primeros y en la cepa CD1 el segundo, mientras que DUNSMORE y col. (1.983), en Canberra y C57BL, obtienen porcentajes inferiores (76,59% y 88,87%), pero situándose del mismo modo los máximos hepáticos el día dos p.i..

En pulmones, el máximo fue más rápido en BALB/c que en C57BL/10: en la primera cepa apareció el tercer día p.i. (19,70%), mientras que en la segunda no se alcanzó hasta el día cinco p.i. (9,18%).

MACCHIONI y MARCONCINI (1.967) y LEE y col. (1.976) observan la mayor retención pulmonar el día tres p.i. (16,23% y 24,77% respectivamente), concordante con nuestros resultados en BALB/c, mientras que DUNSMORE y col. (1.983) observan el máximo pulmonar mucho más elevado en las dos cepas estudiadas, el cuarto día p.i., con un 38,19% en Canberra y un 41,82% en C57BL. De lo anterior se deduce que el máximo pulmonar varía cronológicamente en función de la cepa: el día tres en "ratón albino" y BALB/c, el día cuatro p.i. en C57BL y Canberra, y día cinco p.i. en C57BL/10.

En vísceras también hubo diferencia en las cepas estudiadas, tanto en el tiempo como en el número de larvas. En BALB/c la tasa larvaria fue superior (8,52%) y más rápida en el tiempo (quinto día p.i.), que en C57BL/10, con migración más lenta (máximo el séptimo día p.i., con un 3,46%). Ninguno de los autores consultados realiza este recuento englobando los mismos órganos que nosotros (corazón, riñones y bazo), por lo que no se pueden comparar estos resultados.

El valor máximo en el músculo de las patas traseras fue similar en ambas cepas (BALB/c: 13,16% y C57BL/10: 12,57%). En esta localización también se hizo patente la mayor velocidad de migración de T.canis en BALB/c. DUNSMORE y col. (1.983) detectan el máximo a los ocho días p.i., tanto en Canberra como en C57BL, lo que se encuentra muy cercano a nuestros resultados en BALB/c y muy lejano de C57BL/10. Sin embargo y prescindiendo de los máximos, encontramos que en BALB/c la meseta abarca desde el día cinco hasta el 21 p.i. (con el máximo el día 10 p.i.), mientras que en C57BL/10 dicha meseta comienza el día siete p.i. y se mantiene hasta el día 63 p.i.

(con máximo el día 49 p.i.). Esto indica que, al menos en esta localización, no es coherente utilizar el máximo como valor absoluto.

En la canal, de nuevo comprobamos la mayor rapidez en la migración larvaria de T.canis en BALB/c. En esta cepa, ya el tercer día p.i. se detectó una cantidad significativa de larvas (12,33%), aumentando progresivamente para alcanzar el máximo (63,05%) a los 15 días p.i.. Este comportamiento difiere del observado en C57BL/10, donde se pasó bruscamente de un 5,30% el día cuatro p.i., a un 36,42% el día cinco p.i., para llegar al máximo a las dos semanas, con un porcentaje de larvas ligeramente superior (69,54%).

LEE y col. (1.976) obtienen resultados concordantes con los nuestros, en lo que se refiere a BALB/c utilizando "ratón albino", en cuanto al máximo porcentaje de recuperación en la canal (65,62%), aunque éste se alcanza más tarde (día 28 p.i.), frente al día 15 p.i. de nuestros resultados. DUNSMORE y col. (1.983) aportan datos que se asemejan más en el tiempo, pues es el día ocho p.i. cuando encuentran la máxima acumulación en la canal, sin detectar diferencias significativas entre las dos cepas estudiadas (Canberra: 35,14% y C57BL: 44,09%), siendo los porcentajes, sin embargo, muy inferiores a los detectados por nosotros.

MACCHIONI y MARCONCINI (1.967) observan la máxima acumulación larvaria en la canal el décimo día p.i., con un porcentaje (70,75%) algo superior a los nuestros (63,05% en BALB/c y 69,54% en C57BL/10 a los 15 días p.i.). KAYES y OAKS (1.976) estudian por separado la canal anterior y la canal posterior, en la cepa HaM/ICR, detectando en todo momento una mayor cantidad de larvas en la primera, y observando los máximos a días muy diferentes (canal anterior en el día 28 p.i., y canal posterior en el día siete p.i.). Sin embargo, si contabilizamos el número de larvas que recuperan en conjunto entre ambas canales, observamos que obtienen el máximo, igual que en nuestro caso, a las dos semanas p.i., y con porcentaje equivalente al de MACCHIONI y MARCONCINI (1.967), (70,58% frente al 70,75% respectivamente). Otros autores que encuentran el máximo en la canal a tiempos muy cercanos al nuestro, son BARRIGA y MYSER (1.987) con un 67,41% el día 20 p.i. en la cepa BALB/cBYJ, o SUGANE y OSHIMA (1.983) que en la misma cepa que nosotros (BALB/c), encuentran el máximo a las dos semanas p.i. con un porcentaje (64,21%) totalmente concordante con el nuestro (63,05%).

En la recuperación larvaria del cerebro los máximos se detectaron en BALB/c el día 63 p.i. (51,78%) y en C57BL/10 el día 49 p.i. (31,92%), siendo este momento el único en que se observó un número significativo de larvas en este órgano en la última cepa. Al ser el cerebro "el fondo de saco" teórico de las larvas de T. canis en su migración en el hospedador paraténico (DUNSMORE y col., 1.983), a la hora de comparar nuestros resultados en este órgano con los de los diferentes autores, es especialmente importante referirnos al final de las experiencias.

DUNSMORE y col. (1.983), estudiando C57BL, observan la colonización del cerebro prácticamente al mismo tiempo que nosotros en C57BL/10, aunque los porcentajes de recuperación obtenidos difieren considerablemente (87,91% de estos autores frente al 31,92% en nuestro caso). LEE y col. (1.976) realizan el estudio durante 56 días, encontrando el máximo el último día, con un 44,11%; algo similar a lo que encontramos en BALB/c al final de la experiencia (51,78%). La mayoría de los autores consultados observan el máximo cerebral el último día de sus trabajos: MACCHIONI y MARCONCINI (1.967) con "ratón blanco" (43,09% - día 30 p.i.), KAYES y OAKS (1.976) con la cepa HaM/ICR (27,35% - día 56 p.i.), DUNSMORE y col. (1.983) con Canberra (92,23% - día 122 p.i.) y con C57BL (87,91% - día 50 p.i.), BARRIGA y MYSER (1.987) con BALB/cBYJ (57,79% - día 33 p.i.).

Otros autores no encuentran el mayor porcentaje en cerebro al finalizar sus experiencias, como SUGANE y OSHIMA (1.983) en BALB/c, con el máximo a los 70 días p.i. (61,01%), en una experiencia que finaliza el día 84 p.i. con un porcentaje cerebral del 57,84%; o ABDEL-HAMEED (1.984) que con CD1 encuentra el máximo porcentaje en cerebro a los 14 días p.i. (23,3%) y termina la experiencia el día 28 p.i. con un 20,6% de larvas en este órgano. Uno de los casos más significativos es el de OKOSHI y USUI (1.968), quienes, sin especificar la cepa con la que trabajan, obtienen el máximo cerebral a los nueve días p.i. (35,37%), mientras que el último día de su trabajo (60 p.i.) tan sólo observan un 17,56%. En nuestro caso, y para la cepa C57BL/10, el máximo en cerebro también se observó antes de finalizar la experiencia (día 49 p.i.), pero con la diferencia de que la disminución en cerebro se complementó con un aumento en la recuperación larvaria hepática, mientras que los autores citados no encuentran incremento alguno en el porcentaje de recuperación en hígado a expensas de la disminución

cerebral. Esto parece demostrar que la migración puede ser reversible en función del haplotipo, siendo la primera vez que se comprueba este hecho.

Sin embargo, este resultado no es compatible con las afirmaciones de BURREN (1.968) quien sugiere que las larvas de T. canis no pueden abandonar el cerebro de los ratones. Esta hipótesis ha sido cuestionada anteriormente (DUNSMORE y col., 1983), pues parece lógico pensar que si las larvas pueden atravesar la placenta para infestar ratones prenatalmente o alcanzar las glándulas mamarias e infestar así a recién nacidos (LEE y col., 1.976), también podrían atravesar la barrera hematoencefálica y movilizarse, comportándose como un reservorio para la infestación de las siguientes generaciones. ABO-SHEHADA y HERBERT (1.985) apuntan la posibilidad de que las larvas de T. canis pudieran migrar de nuevo desde cerebro a la fase visceral, comprobando que las larvas inyectadas directamente en el cerebro de ratones se recuperan de músculo, hígado y pulmones los días tres, cinco y siete p.i., aunque es evidente que la vía de inoculación es totalmente distinta de la que mimetiza la natural.

En consecuencia, se puede concluir que la migración de las larvas de T. canis es reversible.

De lo anterior se desprende que no existe un patrón migratorio para las larvas de T. canis en el modelo murino salvo teniendo en cuenta las cepas utilizadas. PARSONS y GRIEVE (1.990, a) lo estudian experimentalmente inoculando animales de distintas cepas y haplotipo (H-2) diferente, para investigar la influencia del genotipo del hospedador en la retención larvaria hepática. Estudian las cepas C57BL/6J-b, SWR/J-q, AKR/J-s, C₃H/He-k, BALB/c ByJ-d, DBA/2J-d y SJL/J-s y observan que los ratones de la cepa C57BL/6J retienen significativamente más larvas que los de la cepa DBA/2J (73 larvas frente a 18,7 respectivamente), mientras que el resto de las cepas retienen a un nivel inferior, pero estadísticamente similar al de C57BL/6J.

En consecuencia, se puede concluir que la migración de las larvas de T. canis es reversible.

ABO-SHEHADA y HERBERT (1.989) investigan la influencia de la cepa murina en la infestación experimental con T. canis, observando que se produce un mejor asentamiento de los parásitos en CD1 que en NIH, y referente al sexo, en los machos de CD1 hay mayor retención hepática que en los machos de NIH. Todo ello confirma la importancia de utilizar grupos de animales uniformes y, por supuesto de la misma cepa, en aquellas experiencias donde se utilice el modelo murino para T. canis.

En consecuencia, se puede concluir que la migración de las larvas de T. canis es reversible.

En consecuencia, se puede concluir que la migración de las larvas de T. canis es reversible.

Tras el tratamiento estadístico, mediante la "t de Student", referido a los porcentajes y número total de larvas recuperadas para las dos cepas murinas en los distintos días de estudio, obtuvimos los resultados siguientes:

En hígado, hubo diferencias significativas entre las dos cepas para diferentes márgenes de probabilidad, los días 2, 3, 4, 10, 15, 21, 35, 49 y 63 p.i., lo que indica una retención en el órgano independiente del parásito y dependiente de la cepa de hospedador, favorecida en C57BL/10 (donde el porcentaje de larvas recogidas fue superior a lo largo de toda la experiencia).

En pulmones la diferencia estadística a distintos niveles de probabilidad, se mantuvo los días dos, tres y cuatro p.i., lo que incide en la misma conclusión que la referida al hígado: la pauta migratoria entre dos órganos inmediatamente próximos en el sistema circulatorio es diferente y dependiente del hospedador; pero, en este caso, la diferencia fue a favor de BALB/c, cepa en la que las larvas alcanzaron antes los pulmones por abandonar el hígado más rápidamente que en C57BL/10.

En vísceras, se mantuvo la diferencia en la velocidad migratoria los días tres, cuatro y cinco p.i., con diferencias estadísticamente significativas, igual que en pulmones y por la misma razón, a favor de BALB/c.

En cuanto al músculo de las patas traseras, las dos cepas se diferenciaron ligeramente los días 4, 5, 10 y 49 p.i. a favor de BALB/c, mientras que el resto de los días no se observaron diferencias significativas.

En la canal, se observaron diferencias significativas en primer lugar los días tres y cuatro p.i. a favor de BALB/c (no habiendo sido colonizado todavía esta localización en C57BL/10) y posteriormente los días 10, 15 y 21 p.i. en los que los porcentajes larvarios fueron mayoritarios en C57BL/10. Desde este momento se observó un comportamiento prácticamente homogéneo durante toda la experiencia.

En cerebro, la pauta migratoria también fue distinta; el día dos p.i. no hubo diferencia significativa, lo cual es lógico, puesto que en ambos casos ninguna larva había conseguido atravesar la barrera hematoencefálica.

En los días tres y cuatro p.i. en BALB/c se encontraron larvas frente a ausencia de la mismas en C57BL/10. Curiosamente, el día cinco p.i. no hubo diferencia estadística entre las dos cepas en este órgano; si bien hasta este momento la migración a cerebro fue gradual y precoz en BALB/c, mientras que resultó más tardía y brusca en C57BL/10. El resto de los días se observó diferencia significativa con un predominio larvario en BALB/c frente a C57BL/10. Parece claro que la barrera cerebral se vence con mayor facilidad en la primera de las cepas y, además, de forma unidireccional.

En lo que se refiere al número total de larvas recuperadas cada día, sumando las encontradas en todos y cada uno de los órganos estudiados, el análisis estadístico arrojó una diferencia significativa entre las dos cepas, para casi todos los días de la experiencia: días 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 y 63 p.i., siendo ésta cuantitativamente favorable para BALB/c los días 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 63 p.i.

5.1.2.- SELECCION DE ORGANOS MAS REPRESENTATIVOS

Como consecuencia de la capacidad de las larvas de T. canis para migrar por casi todos los tejidos corporales, los autores consultados examinan una gran variedad de tejidos: OKOSHI y USUI (1.968) digieren intestino, hígado, pulmones, vísceras (corazón, riñones, páncreas y bazo), canal y cerebro; KAYES y OAKS (1.976) estudian hígado, corazón, pulmones, sistema genitourinario, canal anterior, canal posterior y cerebro; SHARMA y BHATIA (1.983) analizan intestino, hígado, pulmones, cerebro y riñones; PROKOPIC y FIGALLOVA (1.982) examinan hígado, pulmones, corazón, tráquea, diafragma, lengua, músculos intercostales, bazo, músculo de la pata; cerebro y ojos; ABO-SHEHADA y col. (1.985) y ABO-SHEHADA y HERBERT (1.985) realizan un completo estudio migratorio en: estómago, intestino delgado, cavidad peritoneal, hígado, pulmones, riñones, médula espinal, glándulas salivares, útero, musculatura y cerebro; WADE y GEORGI (1.987) examinan intestino, hígado, pulmones, riñones, órganos genitourinarios, piel, canal y cerebro; etc...

En nuestro caso, cuando planteamos el estudio del comportamiento migratorio de T. canis, optamos por analizar hígado, pulmones, vísceras (incluyendo corazón, riñones y bazo), músculo de las patas traseras, canal y

cerebro. Como cabía esperar, encontramos larvas en todos ellos a lo largo de los distintos días de nuestro estudio. A continuación, y con el fin de establecer un modelo experimental que nos sirviera como instrumento para posteriores estudios de protección y tratamiento, seleccionamos los cuatro órganos más significativos para estas experiencias y que vinieran a representar las dos fases de la migración larvaria de T. canis: hígado y pulmones como órganos representativos de la primera fase de migración, fase hepato-pulmonar, y canal y cerebro como exponentes de la segunda fase o migración miotrópica-neurotrópica.

La elección está refrendada por otros modelos, donde estos cuatro órganos son mayoritariamente los seleccionados: BARRIGA y MYSER (1.987) seleccionan hígado, pulmones, canal y cerebro en estudios de protección con larvas irradiadas; NICHOLAS y col. (1.984) seleccionan los mismos órganos para ensayar la capacidad protectora del antígeno E/S; CONCEPCION y BARRIGA (1.985) hacen la misma elección en estudios de protección mediante transferencia de células de nódulos linfáticos y suero inmune. Otros autores seleccionan estos cuatro órganos a la hora de diseñar experiencias con antihelmínticos, como CASAROSA y col. (1.983) en estudios con ivermectina, ABDEL-HAMEED (1.984, a) evaluando la actividad de tiabendazol o CARRILLO y BARRIGA (1.987) ensayando los efectos de hidrato de levamisol e ivermectina.

Sin tener en cuenta las larvas localizadas en vísceras y músculo de las patas traseras, volvimos a calcular los porcentajes de larvas respecto al total recuperado para cada una de las dos cepas estudiadas, realizando el tratamiento estadístico de la "t de Student", referido a los porcentajes por órgano y número total de larvas recuperadas.

En hígado, volvimos a encontrar diferencias significativas entre las dos cepas los mismos días que en el estudio con los seis órganos: los días 2, 3, 4, 10, 15, 21, 35, 49 y 63 p.i., siendo igualmente los porcentajes de larvas encontrados en hígado en el caso de C57BL/10 superiores a los de BALB/c.

En pulmones la diferencia estadística a distintos niveles de probabilidad, se siguió manteniendo los días dos, tres y cuatro p.i., siendo la

diferencia favorable a BALB/c, donde las larvas alcanzaron antes los pulmones por abandonar el hígado más rápidamente que en C57BL/10.

En la canal, observamos esta vez diferencias significativas los días tres, cuatro y cinco p.i. a favor de BALB/c, por no haber sido colonizado el músculo de esta localización en C57BL/10 durante estos días; y los días 10, 15, 21 y 35 p.i., en este caso con porcentajes larvarios superiores para C57BL/10. A partir de este momento el comportamiento en la canal fue homogéneo en ambas cepas.

En cerebro los días tres y cuatro p.i. encontramos larvas en BALB/c frente a ausencia de las mismas en C57BL/10. El día cinco p.i. no apreciamos diferencias entre las dos cepas en esta órgano, y el resto de los días, excepto el día 49 p.i., reflejaron diferencias significativas con predominio del número de larvas en BALB/c frente a C57BL/10.

En lo que se refiere a las larvas totales recuperadas cada día, sumando las encontradas en los cuatro órganos seleccionados, lógicamente vemos reducido el número en ambas cepas, desapareciendo por este motivo las diferencias significativas entre ambas los días tres y 10 p.i., y manteniéndose las mismas durante los días 2, 4, 5, 7, 15 y 63 p.i..

A la vista de los resultados, seleccionamos hígado, pulmones, canal y cerebro como órganos representativos para establecer un modelo experimental controlado sobre la migración larvaria de T. canis en hospedadores paraténicos. En la elección entre las dos cepas optamos por BALB/c sobre C57BL/10, porque en ella las larvas de T. canis mostraron un patrón migratorio uniforme y unidireccional, y sin comportamientos anómalos o diferentes a los que cabría esperar, como fué el caso de C57BL/10, donde las larvas además de mostrar una mayor lentitud en su migración, experimentaron un abandono del cerebro y un retorno al hígado al final de la experiencia.

Sobre el modelo así establecido (hígado, pulmones, canal y cerebro, y cepa BALB/c), ampliamos nuestro estudio sobre el comportamiento migratorio de T. canis hasta un año p.i., comparando los resultados obtenidos en este momento con los del último día de nuestro estudio inicial (día 63 p.i.).

La distribución larvaria por órganos no mostró diferencias apreciables, lo que viene a indicar que en BALB/c, el asentamiento larvario de T. canis en canal y cerebro, a las nueve semanas de la infestación, es ya definitivo. Después de un año p.i., estas localizaciones siguieron siendo las mayoritariamente colonizadas, si bien el porcentaje larvario se vió disminuido en la canal (pasando de un 41,15% el día 63 p.i. a un 30,22% al año p.i.) y aumentado en cerebro (desde un 56,02% el día 63 p.i. a un 67,59% al año p.i.).

La disminución del porcentaje larvario en la canal se correspondió con un descenso en el número real de larvas en esta localización, pero el aumento del porcentaje cerebral no se debió a un incremento en la cantidad de larvas en este órgano, sino a una disminución estadísticamente significativa en el número total de larvas recuperadas de todos los órganos, incluido cerebro. A las nueve semanas de la infestación, la media del total larvario fue de 78,66 larvas, mientras que al cabo de un año, ésta fue tan sólo de 29 larvas (diferencia estadísticamente significativa para $p < 0,05$). El descenso en el número total de larvas recuperadas con el tiempo es un hecho descrito por distintos autores, como ABO-SHEHADA y HERBERT (1.985), quienes coinciden con nosotros al indicar que cuando los estudios de migración se prolongan hasta un año, el número de larvas recuperadas va disminuyendo gradualmente, o WADE y GEORGI (1.987), que del mismo modo observan que la cantidad total de larvas en ratones infestados experimentalmente, muestra un curso decendente con el tiempo.

5.1.3.- INVESTIGACION DE LARVAS EN LA CAVIDAD PERITONEAL

Al investigar la presencia de larvas de T. canis en localizaciones diferentes a las habitualmente examinadas, como es la cavidad peritoneal, hemos obtenido resultados, si bien escasos numéricamente, sí positivos para la casi totalidad de los días analizados. En ambas cepas, el máximo apareció a los cinco días p.i., con una media de cinco larvas en BALB/c y de ocho larvas en C57BL/10, dejando prácticamente de detectarlas a partir del día 35 p.i..

Entre las referencias bibliográficas consultadas, autores como ABO-SHEHADA y HERBERT (1.985), BARRIGA y MYSER (1.987), y PROCIV (1.989, a)

amplian el estudio de la pauta migratoria de T. canis investigando la presencia de larvas en la cavidad peritoneal y lavado de las vísceras abdominales.

ABO-SHEHADA y HERBERT (1.985) estudiando la migración postintestinal en ratones NIH, observan que las larvas pasan a la fase visceral de la migración durante la primera semana p.i., encontrando durante este tiempo larvas en distintas vísceras (hígado, pulmones, riñones, bazo...), pero detectando también larvas que migran a través de cavidades corporales, especialmente la cavidad peritoneal. Estos autores indican que, a continuación, las larvas se dispersan por todo el cuerpo, entrando en la fase miotrópica-neurotrópica el séptimo día p.i., localizándolas a partir de ese momento mayoritariamente en cerebro y musculatura.

BARRIGA y MYSER (1.987) detectan una media de 28 ± 13 larvas en el lavado de la cavidad peritoneal y vísceras abdominales, a los 10 días p.i. en ratones de la cepa BALB/cBYJ. De nuestros resultados y de datos como estos, se desprende que las larvas de T. canis pueden migrar por rutas diferentes a las circulatorias y, presumiblemente, incorporarse a la circulación en el momento adecuado.

Por otro lado, PROCIV (1.989, a) al estudiar la presencia de T. canis en la cavidad peritoneal, observa que inmediatamente después del sacrificio (realizado a las 16 horas p.i.) se recuperan muy pocas larvas de la cavidad peritoneal (8 ± 2), pero cuando los ratones no se procesan inmediatamente tras la muerte, se recuperan muchas más larvas de esta localización (485 ± 105 , y esta cantidad es comparable a la que escapa de los intestinos intactos incubados durante ese tiempo: 305 ± 57). Según estos resultados, el paso hacia la cavidad peritoneal es una ruta minoritaria en el ciclo biológico de T. canis, y la diferencia cuantitativa aparece cuando las larvas abandonan el intestino tras la muerte del hospedador. Este hecho puede influir directamente en las oscilaciones que a menudo ofrecen los resultados de experiencias, que en principio se diseñaron bajo las mismas condiciones.

5.1.4.- RESPUESTA INMUNITARIA EOSINOFILICA

La eosinofilia alta y persistente es uno de los signos en los que se basa el diagnóstico clínico de la L.M.V. (GLICKMAN y col., 1.978) y está presente en la mayoría de las helmintosis que afectan a órganos y tejidos. Debido a las diferencias encontradas en las pautas de migración de T.canis en las cepas estudiadas, creimos conveniente realizar el exámen hemático para establecer si la eosinofilia es igual en ambos casos, o por el contrario, vuelven a manifestarse diferencias en función de la cepa.

En BALB/c, los eosinófilos comenzaron a aumentar el día cinco p.i., con un 6,83% frente al 3% de los controles. En C57BL/10, la eosinofilia también comenzó a manifestarse el mismo día, aunque con menor intensidad, con un 5,33% frente al 3,83% de los animales control.

En BALB/c, el día siete p.i. el porcentaje casi se duplicó alcanzando el 12%, para llegar al máximo, 15,83%, el día 10 p.i.. También prosiguió el aumento en C57BL/10, pues el día siete p.i. presentó un 7%, y el 10 p.i. un 10,83%, que a diferencia de la cepa anterior, no fue el máximo, ya que éste se detectó el día 15 p.i. con un 18,66%.

El resto de la experiencia se prolongó hasta el día 63 p.i., manteniéndose la eosinofilia en niveles superiores al 10% en BALB/c, mientras que en C57BL/10 la caída fue brusca a partir del máximo y con niveles similares o ligeramente superiores a los controles en el día 35 p.i. y restantes.

SUGANE y OSHIMA (1.982) observan en ratones BALB/c, inoculados con 500 huevos embrionados de T.canis, un primer pico eosinofílico, que ellos denominan timoindependiente, a los 10 días p.i. (ya que se detecta indistintamente en ratones nu/+ y en ratones nu/nu), lo que coincide con el encontrado por nosotros para esta cepa; y un segundo pico muy suave, que denominan timodependiente, el día 28 p.i.. Nuestro resultado en ambas cepas, no concuerda con la aparición de este llamado segundo pico. Actualmente está establecido que la inducción de la vía de diferenciación para producir eosinófilos está ligada a la producción de IL-5 por los linfocitos Th2, lo que contradice los resultados anteriores y concuerda con los nuestros.

KONDO y col. (1.975) detectan el máximo de eosinófilos a las dos semanas p.i. en ratones inoculados con 300 y 600 huevos embrionados V.O., siendo estos porcentajes del 10,6% y 15,6% respectivamente (en función de la dosis). A partir de este momento caen gradualmente pero manteniendo, a las nueve semanas de la infestación, un nivel alto en comparación con el grupo control. El máximo detectado por estos autores coincide en el tiempo con el observado en nuestro trabajo el día 15 p.i. en C57BL/10, pero no en BALB/c, donde el máximo apareció a los 10 días de la inoculación.

KAYES y OAKS (1.980) en estudios sobre tres cepas (HM/ICR; C57BL/6J; y AKR/J) infestadas con 1.000 huevos embrionados de T.canis V.O., observan en todos los casos la máxima cantidad de eosinófilos aproximadamente a las dos semanas p.i., lo que se asemeja a nuestros resultados en C57BL/10, detectando a menudo valores 20 a 30 veces superiores a los observados en los controles ($12,9\% = 6.000 \text{ Eos/mm}^3$ frente a $0,43\% = 200 \text{ Eos/mm}^3$).

OSHIMA (1.983), estudiando la respuesta eosinofílica en nueve cepas murinas, AKR, C3H/He, CBA, BALB/c, DBA/2, SJL, A-SW, C57BL/6 y A/J, encuentra que la cepa con respuesta más alta es la SJL, con un pico máximo a los 12 días p.i. del 29,02% y que las cepas menos respondedoras son la A-SW y CBA, con un 4,73% de eosinofilia los días 18 p.i. y 14 p.i., respectivamente. Al comparar con nuestros resultados destaca el hecho de que tanto en BALB/c como en C57BL/6, el máximo encontrado por estos autores, se sitúa alrededor del día 15 p.i. (7,52% y 9,67% respectivamente), momento en que obtuvimos el pico máximo en C57BL/10, difiriendo de nuestro resultado en BALB/c.

Los resultados obtenidos por PRZYJALKOSWI y col. (1.978) en ratones C3H inoculados con 3.000 huevos embrionados de T.canis se asemejan en cierto modo a los de nuestro trabajo para la cepa BALB/c, pues el nivel de eosinofilia más elevado se alcanza a los 12 días de la infestación, momento próximo al día 10 p.i., donde nosotros detectamos el máximo. Sin embargo, mientras que para nosotros el porcentaje alcanzado fué del 15,83%, para estos autores alcanza un 24% (frente al 0,17% de los controles). No obstante esto puede ser debido a la relación dosis-respuesta, ya que su inóculo es tres veces el nuestro en número de huevos, hecho apoyado por MORETTI (1.963) quien señala que la tasa de eosinofilia depende del número de parásitos en el organismo. La subida hasta alcanzar el nivel máximo tam-

bién fue mucho más brusca para PRZYJALKOSWIKI y col. (1.978), quienes el día ocho p.i. tienen unos valores de eosinofilia del 4,4%, y el 12 p.i. alcanzan ya el 24%. En nuestro caso los eosinófilos se elevaron más lentamente, pues en el séptimo día p.i. se observó un 12% y el décimo día p.i. se llegó al 15,83% (nivel máximo).

También SUGANE y OSHIMA (1.980) inducen una alta eosinofilia periférica en ratones JCL:ICR infestados con 500 huevos embrionados de T.canis a los 12 días p.i. e inyectados intraperitonealmente con extracto antigénico homólogo. El máximo aparece entre los dos días en que nosotros detectamos el pico de eosinofilia para las dos cepas, a los 10 y 15 días de la inoculación con huevos embrionados de T.canis.

HIGA y col. (1.990) coinciden con nuestros resultados en C57BL/10, utilizando una cepa murina próxima. Cuando inoculan ratones C57BL/6 con 1.000 huevos embrionados, observan un pico eosinofílico en sangre periférica el día 14 p.i., que decae gradualmente hasta el final de la experiencia, el día 28 p.i.. Nosotros, empleando la cepa C57BL/10 y el mismo inóculo de huevos, detectamos el máximo porcentaje de eosinófilos el día 15 p.i. y a partir de este momento observamos un descenso hasta el final de la experiencia. En cambio en BALB/c tras el máximo (día 10 p.i.), la eosinofilia se mantuvo hasta el último día de nuestro trabajo (día 63 p.i.).

MARUYAMA y col. (1.991) establecen la correlación entre los focos eosinofilopoyéticos hepáticos y la eosinofilia en sangre periférica en la cepa C57BL/6, encontrando que el pico en ambos casos se presenta el mismo día (15 p.i.).

DIMAYUGA y col. (1.991) también estudian la eosinofilia mediante la detección de eosinofil-peroxidasa (EPO), en CBA/J inoculados con 250 huevos embrionados de T. canis, y encuentran una acumulación de la misma en pulmones desde la segunda semana p.i. hasta la sexta semana p.i. en que finaliza la experiencia. En miocardio los niveles máximos de EPO aparecen el día 14 p.i., descendiendo durante el resto de las seis semanas, lo que se asemeja al momento en que encontramos el máximo porcentaje de eosinófilos en C57BL/10 (día 15 p.i.) y concuerda con nuestra observación de una eosinofilia descendente hasta el final de nuestro trabajo.

La eosinofilia inducida por T. pteropodis, difiere de la provocada por T. canis. PROCIV (1.985) estudia la eosinofilia en ratones QB inoculados con 200 y 1.000 huevos embrionados de T. pteropodis, tomando como controles positivos ratones inoculados con 700 huevos embrionados de T. canis. Al comparar con éstos, resulta sorprendente la ausencia de respuesta eosinofílica en las seis primeras semanas de la infestación. Para 200 huevos embrionados de T. pteropodis, a los 40 días p.i. observa una eosinofilia de tan sólo el 1%, que se eleva al pico máximo del 7% el día 85 p.i.. Para 1.000 huevos embrionados del mismo ascárido, a los 28 días p.i. detecta un 2% y el máximo aparece al 50º día p.i. con un 8% de eosinófilos. Los controles con T. canis dan valores del 4,28% y 13,09% a las dos y cuatro semanas p.i., los cuales también resultan bajos comparados con los observados en nuestro trabajo, tanto para la cepa BALB/c (día 10 p.i. = 15,83%) como para la C57BL/10 (día 15 p.i. = 18,66%).

En definitiva, la eosinofilia inducida por T.canis en los tejidos de distintas cepas murinas se caracteriza por la aparición de un pico eosinofílico, generalmente a las dos semanas p.i., que se mantiene descendiendo lentamente en función del tiempo, lo que concuerda con la duración de la eosinofilia en los casos humanos de L.M.V.. Según las cepas, hay ligeras diferencias en el momento de presentación del máximo y éste tiene una intensidad dosis dependiente. Llama la atención el hecho experimental obtenido en C57BL/10 de la transitoriedad de la eosinofilia, así como su desplazamiento a la derecha, comparada con BALB/c.

Otro dato a resaltar es el de la diferencia de la eosinofilia provocada por tres especies del mismo género en el modelo murino: T.cati induce una eosinofilia precoz que se manifiesta el primer día p.i. (PROKOPIC Y FIGALLOVA, 1.982); T.canis comienza algo más tarde (hacia el quinto día, según nuestros datos) y T.pteropodis comienza a partir del día 40 p.i. (PROCIV, 1.985). Estas distintas respuestas podrían atribuirse a diferencias en la capacidad estimuladora eosinofílica de los productos de excreción-secreción de dichas especies, y estudios posteriores deben determinar si también se manifiesta esta diferencia en la capacidad quimiotáctica eosinofílica comprobada ya en los productos de excreción-secreción de T.canis.

5.1.5.- RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL

La producción de anticuerpos específicos frente al antígeno E/S fue similar en ambas cepas. Los autores consultados, aún empleando técnicas diferentes, comienzan a detectar anticuerpos a títulos significativos a partir de la segunda semana p.i., lo que coincide con nuestros resultados y con los obtenidos por CUELLAR y col., (1.990, c) en pauta simple de inoculación en ambas cepas. Este comienzo de la respuesta coincide en el tiempo con el máximo de la eosinofilia, no estableciéndose una relación directa entre la dinámica de ambos parámetros, ya que los anticuerpos se mantuvieron elevados en las dos cepas estudiadas hasta el fin de la experiencia, y la eosinofilia se mantuvo en BALB/c, pero no así en C57BL/10.

Comparando la dinámica de anticuerpos con la pauta de migración larvaria, encontramos que la producción de los mismos comenzó cuando la población larvaria había abandonado el hígado y se había asentado en la canal, existiendo una relación entre la colonización del bazo (órgano linfoide secundario encargado del procesamiento de los antígenos que discurren por vía hemática), a finales de la primera semana, y el comienzo de la producción de anticuerpos, proceso que viene a durar en nuestra experiencia unos diez días.

5.2.- TRATAMIENTO CON MEBENDAZOL

5.2.1.- EVALUACION MEDIANTE RECUPERACION LARVARIA

La búsqueda de un antihelmíntico larvicida, que destruya las formas larvarias de T. canis, tanto en las perras gestantes, evitando la infestación prenatal y la transmisión al hombre, como en los casos de infestación humana por este parásito, constituye un objetivo interesante al que se han dedicado diversos trabajos, utilizando el modelo experimental murino.

A la hora de evaluar agentes larvicidas "in vivo" sobre el modelo experimental establecido, escogimos mebendazol como primero de los quimioterápicos a ensayar, conocida su relativa eficacia sobre distintas helmintosis, administrándolo bajo formulación y vehículos diferentes.

5.2.1.1.- EFICACIA DEL TRATAMIENTO EN FASE HEPATO-PULMONAR

En la primera parte de nuestra experiencia, el agente a ensayar se administró durante los tres primeros días p.i., cuando la población larvaria hepato-pulmonar es más elevada (98,74% el día dos p.i. y 83,44% el día tres p.i.), sacrificando los animales a la primera semana p.i., cuando ya muy pocas larvas permanecen en estas localizaciones (11,88%). Nos planteamos por tanto comprobar, además de la eficacia sobre carga parasitaria total, si mebendazol es capaz de provocar una retención, fundamentalmente hepática, con el consiguiente impedimento para entrar en la fase miotrópica-neurotrópica de la migración.

Observamos mayor eficacia del producto en los lotes IIa y IIIa (100 mg/kg/día de mebendazol comercial -Lomper- y 100 mg/kg/día de mebendazol, ambos en carboximetilcelulosa, respectivamente), y VIIa (25 mg/kg/día de mebendazol en dispersión sólida en polietilenglicol), hecho explicable por tratarse del producto vehiculado en carboximetilcelulosa, disolvente inerte que favorece la disolución del mebendazol, (lotes IIa y IIIa), y el producto formulado como dispersión sólida en polietilenglicol, (lote VIIa),

formulación galénica que permite la fácil disolución de este preparado en medio hidrófilo.

Respecto al lote IVa (100 mg/kg/día de mebendazol en agua) el número de larvas recuperadas fue equiparable al del control, lo que concuerda con la escasa solubilidad de este compuesto en agua.

En el caso de mebendazol dispersado en polietilenglicol, observamos un aumento progresivo en la eficacia del producto a medida que se reduce la dosis del mismo. Si tenemos en cuenta el volumen de agua utilizado para disolver las tres dosis, que fue el mismo, posiblemente en el lote Va (100 mg/kg/día) conseguimos tan sólo una humectación y no una verdadera disolución del principio activo. Al ser menor lo disuelto se absorbieron menos moléculas y su eficacia en cuanto a reducción de la carga parasitaria total fracasó. Sin embargo en los lotes VIa (50 mg/kg/día) y VIIa (25 mg/kg/día) en los que se disolvió menos dosis en el mismo volumen, conseguimos una mejor disolución, una mayor absorción y por tanto un mejor efecto larvicida.

Al estudiar la distribución larvaria por órganos, llama la atención la retención de larvas en hígado en los lotes IIa, IIIa, IVa, Va y VIa, con unos incrementos del 16,62% al 49,95% sobre el lote control. Como consecuencia, en estos mismos lotes, el número de larvas que llegaron a colonizar el cerebro resultó inferior, con una disminución en los porcentajes entre el 10,66% y el 22,94% por debajo del lote control.

En los lotes IIa y IIIa (100 mg/kg/día de mebendazol comercial -Lomper- y 100 mg/kg/día de mebendazol, ambos en carboximetilcelulosa, respectivamente), se manifestó una notable retención hepática, más marcada en el primero (con un 62,02% de larvas en hígado respecto al 12,07% del control), y que afectó a la distribución posterior a la canal, produciéndose en ambos casos una limitación significativa en el acceso al compartimento cerebral (reflejada en aproximadamente un 22% de larvas menos).

A pesar de que mebendazol disuelto en agua no supuso una reducción en el número total de larvas, si produjo una discreta retención hepática respecto al control (un 10,93% más de larvas). Los lotes tratados con mebendazol en dispersión sólida a distintas dosis, mostraron

comportamientos diferentes: a la dosis más alta (100 mg/kg/día), lote Va, no hubo reducción en el número total de larvas, aunque si una cierta retención hepática (sobrepasando el porcentaje larvario del lote control en un 22,24%).

En el caso del lote VIa (50 mg/kg/día) la retención hepática fue menor (un 16,62% más de larvas que el control), pero en cambio, el porcentaje de reducción de la carga parasitaria total fue del 25,45% respecto al control. Esta tendencia a la disminución en la retención hepática y al aumento del porcentaje de reducción larvaria total, se acentuó con la dosis más baja (25 mg/kg/día), lote VIIa, en donde la población larvaria en hígado es similar a la del lote control (Lote Ia -Control-: 12,07% y lote VIIa: 16,65%), pero la reducción de la carga parasitaria total alcanzó el 39,31%.

El análisis de los resultados indica que utilizando mebendazol en dispersión sólida, hay una relación directa entre la dosis y la retención hepática (34,31%, 28,69% y 16,65% de larvas en hígado para las dosis de 100, 50 y 25 mg/kg/día respectivamente), e inversa, entre la dosis y el acceso al cerebro (14,48%, 16,76% y 33,43% de larvas en cerebro para las dosis de 100, 50 y 25 mg/kg/día respectivamente), así como entre la dosis y el porcentaje de reducción en el número total de larvas (126,50; 76,16 y 62 larvas totales para las mismas dosis respectivamente). Esto parece indicar que las dosis altas de mebendazol en esta dispersión sólida de polietilenglicol actúan como larvostáticas mientras que las inferiores presentan una acción larvicida.

5.2.1.2.- EFICACIA DEL TRATAMIENTO EN FASE MIOTROPICA-NEUROTROPICA

Para la segunda parte del protocolo, el tratamiento se administró durante los días cuatro, cinco y seis p.i., tras haberse comprobado previamente la presencia de un número elevado de larvas en la canal (34,96% y 59,55% los días cuatro y cinco p.i.) y escaso en cerebro (7,15% y 15,64% los mismos días), sacrificando los animales a las siete semanas p.i., cuando la cantidad de larvas en cerebro resulta ya elevada en condiciones normales (47,07%). Es decir, el objetivo se planteó como la comprobación de si mebendazol es capaz de matar las larvas que se encuentran en la canal o

bien si las retiene evitando que lleguen a cerebro, además de evaluar la acción de este compuesto sobre la carga parasitaria total.

Al analizar los resultados obtenidos observamos que, a efectos de número total de larvas recuperadas, mebendazol fue activo, aun teniendo en cuenta la mortalidad natural de las larvas con el tiempo. En conjunto, observamos que en los lotes IIb, IIIb, Vb, VIb y VIIb (todos excepto el lote IVb, correspondiente a mebendazol en agua), el producto fue prácticamente igual de activo y más que cuando el tratamiento se administró en fase hepato-pulmonar, con unos porcentajes de reducción que oscilaron entre el 56,79% y el 65,97% respecto al lote control, frente a los obtenidos en la primera fase de tratamiento que se situaron entre el 25,45% y el 42,58%.

La distribución por órganos se mantuvo en general homogénea, excepto en el lote VIIb (25 mg/kg/día de mebendazol en dispersión sólida), donde apreciamos una marcada reducción del porcentaje larvario en la canal (un 20,42% de larvas menos que en el control), acompañada de un aumento del porcentaje cerebral (18,85% por encima del testigo). En los tres lotes tratados con mebendazol en dispersión sólida de polietilenglicol (Vb, VIb y VIIb) se observó una disminución en el efecto larvistático del producto, al igual que en fase hepato-pulmonar, en este caso reflejada a nivel de colonización cerebral, a medida que disminuyó la dosis administrada, recuperándose unos porcentajes del 56,63%, 61,80% y 73,23% respectivamente. A pesar de que en esta fase del tratamiento no observamos un mayor efecto larvicida al rebajar la dosis de producto como se observó en fase hepato-pulmonar, los resultados sugieren de nuevo un menor efecto larvistático.

De todos estos resultados cabe destacar como hechos más sobresalientes que la segunda pauta de tratamiento (durante la fase miotrópica-neurotrópica), resultó más eficaz en la reducción de la carga parasitaria sin apenas afectar a la distribución por órganos; la formulación sólida de mebendazol en polietilenglicol con esta misma pauta de tratamiento, consiguió una reducción de la dosis eficaz; y la primera pauta (durante la fase hepato-pulmonar), redujo menos el número total de larvas, pero consiguió una retención significativa en la migración.

Nuestros resultados, en lo que respecta a la eficacia de mebendazol sobre la carga parasitaria total, no concuerdan con los obtenidos por

YALCINKAYA (1.977) con otro derivado bencimidazólico (tiabendazol), administrado también a 100 mg/kg. Este autor no encuentra ninguna larva en los ratones tratados a las 48 horas de la inoculación con 250-500 huevos embrionados y sacrificados a los 7-12 días p.i.. Nuestro máximo porcentaje de reducción sobre la carga parasitaria, cuando administramos el tratamiento a ese mismo tiempo (fase hepatopulmonar), fue del 42,58%. La mayor eficacia de tiabendazol puede atribuirse a la mayor rapidez en la absorción de éste producto, con lo que se alcanzan rápidamente elevadas concentraciones plasmáticas.

HOLT y col. (1.979) infestan ratones con 1.000 huevos embrionados de T. canis y tratan con mebendazol (300-150 mg/kg/día), entre otros antihelmínticos, durante los días uno, dos, tres y cuatro p.i., sacrificando los animales a las 3-6 semanas postratamiento. No encuentran diferencias significativas entre el número de larvas encontradas en los cerebros de los ratones tratados y de los controles, lo que comparado con nuestros resultados en este órgano y para una pauta de tratamiento similar, aunque diferente en el momento del sacrificio (en nuestro caso fue a la semana p.i.), no coincide en absoluto, pues nosotros encontramos diferencias significativas en los lotes estudiados.

SONNEN (1.979) inocula ratones con 100 larvas y los trata con varios derivados bencimidazólicos a 100 mg/kg/día por V.O. durante tres días consecutivos. El tratamiento se administra en una fase muy tardía de la infestación (90 días), realizando el sacrificio a los 14 días de la primera dosis y obtiene porcentajes de reducción del 24%, 40% y 30% con albendazol, cambendazol y mebendazol respectivamente. Indica asimismo que los resultados son menos eficaces si el tratamiento se administra a los 120 días. Nuestros porcentajes de reducción para mebendazol administrado también en fase miotrópica-neurotrópica, aunque mucho más temprana, superan ampliamente el 30% descrito por este autor y están comprendidos entre el 56,79% y el 65,97%.

NICHOLAS y STEWART (1.979) estudian el efecto de dos bencimidazoles, fenbendazol y oxfendazol, sobre las larvas de T. canis en ratones, administrándolos oralmente en la dieta. Observan que al iniciar el tratamiento a las dos semanas p.i. (en fase miotrópica-neurotrópica más avanzada que en nuestro trabajo) y sacrificar los animales a los 40 días p.i., fenbendazol

administrado durante cuatro semanas mata las larvas en cerebro y musculatura, mientras que si el tratamiento se acorta a dos semanas, la misma dosis de medicamento no es eficaz. Cuando utilizan oxfendazol, consiguen de nuevo efectos larvicidas en cerebro y músculo, aunque el tratamiento se realice sólo durante dos semanas. Esto concuerda más con nuestros resultados, pues aunque utilizamos otro derivado de benzimidazol (mebendazol), observamos efectos larvicidas, excepto en el caso de mebendazol en agua, aun cuando nuestra pauta de administración fue mucho más corta (tan sólo tres días consecutivos) y se realizó mucho antes en el tiempo.

CASAROSA y LUGETTI (1.982) y CASAROSA y col. (1.983) obtienen resultados similares a los nuestros, en cuanto al efecto de retención larvaria y disminución de la colonización encefálica, por parte de otro antihelmíntico, ivermectina, aunque no pertenece al grupo de los bencimidazoles. Inoculan ratones con 2.000 huevos embrionados de T. canis y los tratan con 80 mg/kg por vía S.C. a las 24 horas p.i.. Al sacrificarlos a los siete días p.i., igual que en la primera fase de nuestro trabajo, observan que la migración queda detenida en hígado y pulmones, sin llevarse a cabo la colonización encefálica.

ABO-SHEHADA y HERBERT (1.984) estudian el efecto de albendazol y fenbendazol, a 100 mg/kg/día en ratones CD1. Observan administrando el tratamiento desde el día dos al siete p.i., retención larvaria hepática y disminución de la migración a cerebro y músculo, al igual que nosotros. Si administran los productos desde el día ocho al 13 p.i., no obtienen efectos sobre las larvas, por lo que suponen que cuando éstas alcanzan cerebro y músculo no son susceptibles a los antihelmínticos. En nuestro caso, administrando el tratamiento en fase miotrópica-neurotrópica, las larvas sí resultaron susceptibles al tratamiento en todos los lotes exceptuando el de mebendazol en agua. Podemos justificar nuestros resultados, ya que la administración se realizó durante los días cuatro, cinco y seis p.i., momento en el que ya se encontraban abundantes larvas en la canal y suficientes en cerebro, lo cual demuestra que sí son susceptibles al tratamiento cuando alcanzan estas localizaciones, en contra de lo afirmado por los mencionados autores.

ABDEL-HAMMED (1.984, a) estudia el efecto larvicida y larvistático de nueve benzimidazoles (tiabendazol, mebendazol, fenbendazol, albendazol,

parbendazol, oxibendazol, cambendazol, flubendazol y oxfendazol) administrados en dieta medicada, conteniendo un 0,1% del compuesto puro (130-160 mg/kg/día). Comienza el tratamiento 24 horas p.i. con 500 huevos embrionados y lo continúa durante ocho días, sacrificando la mitad de los animales el día ocho p.i. y el resto el día 22 p.i.. En el día ocho p.i., momento de sacrificio coincidente con el de la primera fase de nuestro trabajo (siete p.i.), observa retención larvaria (excepto los tratados con tiabendazol), igual que lo obtenido por nosotros con mebendazol aunque en nuestro caso, el tratamiento se administró tan sólo durante los días uno, dos y tres p.i.. El efecto larvicida al día 22 p.i., presenta resultados significativos sólo con albendazol, oxfendazol y cambendazol; en cambio nosotros con mebendazol observamos efecto larvicida en todos los lotes, excepto en el correspondiente a mebendazol en agua, cuando administramos el tratamiento los días cuatro, cinco y seis p.i..

ABDEL-HAMMED (1.984, b) estudia el efecto de tiabendazol sobre la migración larvaria de T. canis en ratones CD1 y encuentra que las larvas quedan retenidas en hígado tras la administración de un 0,5% y un 0,25% de este compuesto en la dieta durante ocho días, con retención del 96% y 78% respectivamente. Con dosis inferiores suministradas por la misma vía y con dosis administradas directamente por V.O. (50 mg/kg/día hasta 100 mg/kg dos veces al día) el porcentaje recuperado de hígado no difiere del de los controles. En nuestros resultados con mebendazol (administrado tres días consecutivos por V.O.), sí se produjo retención larvaria significativa para casi todos los lotes tratados durante los días uno, dos y tres p.i..

DELGADO y col. (1.989) estudian el efecto de albendazol en la toxocarosis experimental murina, a 9 mg cada 24 horas durante ocho días y a 3 mg cada ocho horas durante el mismo tiempo. Observan que, en ambos casos, se reduce el número de larvas que llegan a cerebro, lo que coincide con nuestros resultados en la fase de tratamiento hepato-pulmonar, cuando administramos mebendazol los días uno, dos y tres p.i..

5.2.2.- EVALUACION MEDIANTE ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL

Los ensayos en busca de quimioterápicos eficaces frente al parasitismo larvario por T. canis se han venido realizando tradicionalmente, como en otras helmintosis tisulares, evaluando la actividad de los mismos mediante métodos clásicos de recuperación y recuento larvario a partir de los tejidos de animales infestados experimentalmente. Estas técnicas, si bien son sin duda válidas y reflejan incondicionalmente la eficacia "in vivo" de los productos a ensayar, son sin embargo tediosas y presentan múltiples desventajas. La evaluación de los quimioterápicos por métodos inmunológicos, parece una alternativa, sino tan evidente aparentemente, si más rápida y sistematizable, una vez seleccionado el componente serológico a valorar y extrapolada su significación en relación con la actividad terapéutica.

Hemos estudiado la dinámica de producción de anticuerpos específicos frente al antígeno E/S y frente al antígeno total larvario, así como de inmunocomplejos, a lo largo de siete semanas, en ratones inoculados con huevos embrionados de T. canis y sometidos a tratamiento con los distintos preparados de mebendazol, ya descritos en apartados anteriores.

5.2.2.1.- ESTUDIO DE ANTICUERPOS

En lo que respecta a la producción de anticuerpos específicos frente al antígeno E/S en el lote control y en los lotes tratados, ésta respondió básicamente a la dinámica descrita previamente en el modelo murino. Los anticuerpos específicos comenzaron a hacerse patentes a la segunda semana p.i., y fueron aumentando progresivamente y sin oscilaciones, manteniéndose claramente positivos hasta la séptima semana p.i. en que finalizó la experiencia. En los lotes tratados con mebendazol, tanto en disolución acuosa con carboximetilcelulosa o en disolución acuosa simple, los anticuerpos siguieron la dinámica marcada por el lote control, si bien los niveles fueron ligeramente inferiores. Estos resultados no coinciden con los de KATO (1.973) con dietilcarbamacina, quien observa una ligera caída en los títulos de anticuerpos después de la terapia.

Otros autores describen experiencias o casos donde el tratamiento frente a las larvas de T. canis no se ve acompañado de un descenso en el título de anticuerpos específicos, lo cual coincide con nuestros resultados: PETRICH y STOYE (1.981) no observan variaciones en el título de anticuerpos cuando tratan la toxocarosis en el hospedador definitivo con albendazol, fenbendazol y oxfendazol. AGUILA y col. (1.987, b), en experiencias previas realizadas en nuestro laboratorio con sueros de ratones que habían sido tratados con mebendazol (Lomper), no observan variaciones en la dinámica de producción de anticuerpos específicos.

VORTEL y col. (1.983) describen un caso de toxocarosis, demostrado por biopsia hepática y con título elevado de anticuerpos, que no consiguen disminuir tras la administración de tiabendazol. BASS y col. (1.987) tratan a niños diagnosticados de toxocarosis por E.L.I.S.A. mediante tiabendazol, observando que éste producto no parece alterar la dinámica eosinofílica ni el título de anticuerpos tras el tratamiento. SCAGLIA y col. (1.989) citan un paciente que tras el tratamiento con dos ciclos de albendazol a 400 mg/día durante 21 días, mejora clínicamente pero sin presentar descenso en el título de anticuerpos. FENOY y col. (1.992) siguen durante cinco años, la dinámica de anticuerpos específicos en pacientes con L.M.V. tratados con mebendazol (Lomper), y no encuentran seronegativización.

Nosotros, en los lotes tratados con mebendazol en dispersión sólida en polietilenglicol, encontramos una dinámica de anticuerpos similar, pero con niveles ligeramente superiores a los detectados en el resto de los lotes. CUELLAR y col. (1.990, b) al evaluar la eficacia de mebendazol en conejo, encuentran también un aumento de los niveles de anticuerpos postratamiento, pero muy superior al de nuestro modelo experimental.

Por todo ello, la detección de anticuerpos específicos frente al antígeno E/S no resultó útil para monitorizar la eficacia del tratamiento ni fue capaz de detectar la disminución de la carga parasitaria. Por ello planteamos el mismo estudio con antígeno total larvario, con el fin de detectar los posibles anticuerpos producidos como consecuencia de la liberación de los antígenos estructurales tras el tratamiento.

Los resultados obtenidos arrojaron ciertas diferencias respecto a la producción de anticuerpos específicos frente al antígeno E/S. En el lote

control los anticuerpos frente al antígeno total se detectaron con mayor precocidad que los producidos frente al antígeno E/S, lo que puede atribuirse a la menor especificidad de este preparado antigénico. El máximo se observó a las dos semanas p.i., con un Índice de 3,45 (coincidiendo con la aparición de anticuerpos específicos frente al antígeno E/S), manteniéndose los anticuerpos positivos durante toda la experiencia y al igual que ocurre con los anticuerpos frente al antígeno E/S, en los lotes tratados con mebendazol en carboximetilcelulosa y en disolución acuosa (IIb, IIIb y IVb) los niveles se mostraron ligeramente inferiores desde la primera semana p.i.. Del mismo modo, en los lotes tratados con mebendazol en dispersión sólida en polietilenglicol, las tasas de anticuerpos fueron ligeramente superiores a los del control en todos los casos. De nuevo volvemos a observar que no existen diferencias significativas en los niveles de anticuerpos entre los lotes tratados y el control.

5.2.2.2.- ESTUDIO DE INMUNOCOMPLEJOS

Los inmunocomplejos fueron siempre inferiores en los lotes tratados que en el control. En este último, comenzaron a detectarse desde la primera semana p.i., aumentando progresivamente hasta alcanzar el máximo a la sexta semana p.i. (Índice = 3,36) y manteniéndose elevados durante toda la experiencia, con una dinámica paralela a la de anticuerpos específicos frente al antígeno E/S.

La acción de la formulación de mebendazol en carboximetilcelulosa y en agua (lotes IIIb y IVb) fue similar sobre los inmunocomplejos, aunque el preparado en carboximetilcelulosa tiene cierta acción superior entre las semanas cuatro y seis p.i. (Índice = 1,41 a las cinco semanas p.i frente al 2,94 del control la misma semana), y la tasa de inmunocomplejos se recuperó a la séptima semana p.i..

La formulación en polietilenglicol a la dosis de 100 mg/kg/día (lote Vb), provocó una ligera disminución en el nivel de inmunocomplejos, concretamente en las semanas dos y tres p.i. (Índices de 1,94 y 2,07 respectivamente frente a 2,71 y 3,10 del lote control), pero siguiendo un perfil paralelo y cuantitativamente similar al del testigo. La dosis de 25 mg/kg/día (Lote VIIb) indujo disminuciones puntuales y más extensas en las

semanas dos y cinco p.i. (Indices de 1,65 y 1,98 respectivamente frente a 2,71 y 3,10 del control), con dinámica similar pero diferenciable claramente de la del lote testigo.

El lote tratado con 50 mg/kg/día de mebendazol en dispersión sólida por el contrario, mostró una diferencia clara en la tasa de inmunocomplejos detectados respecto al lote control, con Indices situados en niveles no valorables como específicos en el sistema utilizado (Indices del orden de 1,5 durante toda la experiencia). Puede afirmarse que el tratamiento, en este caso, supuso la negativización de este parámetro. Resultados similares, pero más demostrativos, se obtuvieron con el preparado de mebendazol comercial, Lomper; en este caso la señal de fondo no superó el Índice de 1,3 lo que se clasifica como claramente negativo. Sin embargo, en el lote testigo se detectaron inmunocomplejos a partir de la primera semana, con Indices de tres o superiores a partir de la tercera semana p.i..

La efectividad de las distintas formulaciones en la negativización de inmunocomplejos resultó muy variada, oscilando desde la carencia de actividad de mebendazol en agua y carboximetilcelulosa, hasta la acción claramente eficaz de Lomper y mebendazol en dispersión sólida a la dosis de 50 mg/kg/día. Las dosis de 100 mg/kg/día y de 25 mg/kg/día de mebendazol en polietilenglicol mostraron poca actividad, resaltando que la primera de ellas no influyó prácticamente en los inmunocomplejos, aunque la segunda presentó una cierta acción, no manifestada con regularidad.

En definitiva, el producto comercializado como Lomper, ejerció una acción eficaz en la desaparición de inmunocomplejos específicos en el modelo murino y la única preparación con un efecto comparativo fue la de mebendazol en dispersión sólida a 50 mg/kg/día.

La detección de inmunocomplejos específicos supone una medida de la actividad metabólica larvaria y la disminución de esta actividad está directamente relacionada con la fijación del mebendazol a la β -tubulina (LACEY, 1.990) y con el efecto larvistático en hígado descrito por distintos autores. La inmovilización larvaria supone la disminución de la actividad metabólica, descendiendo la producción de los antígenos de excreción-secreción responsables de la formación de inmunocomplejos, lo que sumado a la velocidad de aclaramiento de los mismos, se traduce en su

desaparición casi inmediata de la circulación. En nuestras condiciones experimentales, no se alcanzó el dintel de detección del ensayo para inmunocomplejos específicos circulantes, en el caso de mebendazol comercial - Lomper- en carboximetilcelulosa y en el caso de mebendazol en dispersión sólida a 50 mg/kg/día.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por AGUILA y col. (1.987, b) en ratón y con los de CUELLAR y col. (1.990, b) en conejo, donde el tratamiento con mebendazol (Lomper) supone la negativización inmediata de la tasa de inmunocomplejos. BARSOUM y col. (1.990) también encuentran un fenómeno similar en la esquistosomosis murina tras el tratamiento con praziquantel, no detectando tras el mismo antígeno circulante mediante el método E.L.I.S.A..

5.3.- PRUEBAS DE PROTECCION CON ANTIGENOS

Sobre el modelo experimental establecido, ensayamos la posible acción protectora de dos preparados antigénicos de T. canis (antígeno total de adultos y antígeno E/S) en la toxocarosis experimental murina. La pauta de inmunización empleada en ambos casos fue la misma y consistió en tres inyecciones por vía I.M. con un intervalo semanal, un descanso de dos semanas tras la última inmunización y un inóculo de huevos embrionados por V.O. a la quinta semana del comienzo de la experiencia, para terminar sacrificando los animales a la octava semana. Por otro lado, sangramos los ratones semanalmente con objeto de estudiar la dinámica de la respuesta inmunitaria humoral.

5.3.1.- RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL

En la experiencia con antígeno total de adultos, empleamos un lote control de huevos embrionados, un lote control de adyuvante completo de Freund y un lote inoculado con dicho preparado antigénico. Los sueros se enfrentaron al antígeno total, con los siguientes resultados: el lote control de huevos embrionados no mostró respuesta específica frente a este antígeno, resultado concordante con lo obtenido por CUELLAR y col. (1.990, c). El lote control de adyuvante tampoco reveló anticuerpos específicos frente al antígeno total, hasta la quinta semana p.i., con respuesta algo superior a la observada en el lote control de huevos (pero siguiendo la misma dinámica). Este hecho es atribuible a la estimulación inmunitaria inespecífica provocada por este preparado. El lote inoculado con antígeno total mostró niveles elevados de anticuerpos desde la segunda semana de la experiencia, siguiendo una dinámica claramente ascendente, para alcanzar un máximo (Índice = 8,06) a la quinta semana y manteniéndose elevados durante el resto de la experiencia. El inóculo de huevos embrionados en la semana quinta no contribuyó a una mayor respuesta frente al antígeno total.

Cuando utilizamos el antígeno E/S como inmunógeno, en el lote control de huevos la respuesta se positivizó a la segunda semana tras la inoculación de los mismos (séptima semana de la experiencia completa) con un Índice de 4,03 que ascendió a 4,89 a la semana siguiente. En el lote control de adyuvante fue ya a la primera semana de la inoculación de los huevos

(sexta semana de la experiencia) cuando apareció un Índice prácticamente positivo (2,97), para ascender, siguiendo la misma dinámica que en el caso anterior, a la semana séptima con un Índice de 4,48 y a la octava semana con un Índice de 5,37. El lote sometido a tres inoculaciones de antígeno E/S consiguió un nivel claro de anticuerpos específicos a la quinta semana, antes de haber sido administrados los huevos embrionados. A partir de este momento se observó un efecto aditivo en la respuesta, provocado por la acción inmunogénica del antígeno inoculado y los productos de excreción-secreción producidos por las larvas procedentes del inóculo de huevos, alcanzándose Índices de 5,80 a la sexta semana, 5,98 a la séptima semana y 6,07 a la octava y última semana de la experiencia.

Así pues, en principio, observando la respuesta inmunitaria específica en el lote inoculado con antígeno total de adultos y en el inoculado con antígeno E/S, los niveles de anticuerpos frente a los antígenos homólogos eran lo suficientemente elevados, en ambos casos, en el momento en que realizamos la infestación con el parásito (Índice de 8,06 en el caso del lote inoculado con antígeno total de adultos e Índice de 3,48 en el inoculado con antígeno E/S) para que hubiéramos obtenido una reducción de la carga parasitaria de los animales, si dichos anticuerpos específicos fueran inmunitariamente protectores.

5.3.2.- RECUPERACION LARVARIA

Al evaluar la actividad protectora de los preparados antigénicos ensayados, a través de la carga parasitaria y mediante recuperación larvaria, no obtuvimos resultados satisfactorios en ninguno de los casos.

En lo relativo a los efectos producidos por la inoculación previa de los animales con antígeno total de adultos, sobre las larvas de T. canis, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre el lote control de huevos y el lote inmunizado con antígeno, ni en términos de carga parasitaria total (161,16 larvas en el lote control frente a 147,16 larvas en el lote inmunizado con antígeno) ni en términos de distribución larvaria por órganos (hígado = 8,31% frente a 7,46%; pulmones = 1,28% frente a 1,20%; canal = 65,63% frente a 67,79% y cerebro 27,47% frente a 23,52%, respectivamente para los lotes control e inmunizado con antígeno).

Estos valores difieren de los de IZZAT y OLSON (1.970) que obtienen resultados esperanzadores al inmunizar con extractos antigénicos de adultos, alcanzando un porcentaje de reducción del 52,79%. La dosis de antígeno inmunizante es de 4 mg totales similar a los 4,25 mg utilizados por nosotros, administrada con la misma pauta, pero vía S.C., inoculando una dosis de huevos infestantes tres veces superior a la nuestra y sacrificando los animales una semana antes. También KATO (1.973) induce una resistencia parcial a las infestaciones con T. canis mediante inyección de extractos de T. canis y A. suum. La diferencia es posible que se deba a las distintas cepas murinas utilizadas.

BARRIGA y CARRILLO (1.987) ensayan el efecto de un extracto antigénico total, en este caso obtenido a partir de huevos embrionados, y separado por centrifugación en una fracción soluble y otra particulada, observando un fenómeno curioso: mientras que la fracción soluble administrada en adyuvante completo de Freund reduce la carga parasitaria de los ratones en un 37% y en un 76% cuando se administra con lipopolisacáridos de E. coli, el extracto particulado en el mismo adyuvante completo de Freund la aumenta en un 60%. Este resultado induce a los mencionados autores a pensar en la posible inmunosupresión del hospedador a causa de los productos parasitarios de T. canis.

Al estudiar la acción protectora del antígeno E/S sobre los ratones infestados experimentalmente, tampoco observamos en este caso diferencias estadísticamente significativas a nivel de carga parasitaria total, pues mientras en el lote control de huevos recuperamos 161,16 larvas, en el inoculado con varias dosis de este antígeno encontramos 145,6 larvas (no significativo para $p < 0,05$).

Sin embargo, sí pudimos apreciar una variación en los porcentajes de distribución larvaria en los órganos representativos de la fase miotrópica-neurotrópica de la migración, observando una mayor colonización cerebral (35,72% frente al 27,47% del control) a expensas de una reducción en la población parasitaria localizada en la canal (57,12% frente al 65,63% del control). Este resultado coincide con el descrito anteriormente por BARRIGA y CARRILLO (1.987), apoyando la hipótesis defendida por estos autores sobre el posible efecto inmunosupresor de los antígenos larvarios de T. canis.

La única referencia bibliográfica encontrada que evalúa la actividad biológica del antígeno E/S de T. canis de este modo, es la de NICHOLAS y col. (1.984), quienes consiguen una resistencia significativa a la infestación administrando tres dosis de 1 ug de proteína por vía S.C., con un intervalo entre dosis de tres semanas, infestando los animales a las tres semanas de la última inmunización y utilizando la cepa CBA. Nuestra vía de administración es I.M., el intervalo entre dosis es semanal e infestamos los ratones a las dos semanas de la última dosis de antígeno, empleando la cepa BALB/c. Dichos autores observan que el número de larvas que completan la migración y se establecen en musculatura y cerebro es mucho menor que en el grupo control, contabilizando un 82,59% de reducción en musculatura y un 55,65% en cerebro. En nuestro trabajo también apreciamos una disminución en el porcentaje larvario que llega a colonizar el músculo, siendo el porcentaje de reducción mucho menor (21,13%), pero no apreciamos reducción alguna en cerebro, sino por el contrario un aumento en el porcentaje larvario de aproximadamente un 8% sobre el control.

BARRIGA (1.988), formula la hipótesis de que los productos parasitarios de T. canis podrían suprimir la respuesta inmunitaria del hospedador, en base a las conclusiones extraídas de diversas experiencias: a) la infestación previa con huevos embrionados favorece el desarrollo de los parásitos en una segunda infestación (CONCEPCION y BARRIGA, 1.985); b) la irradiación de las larvas inhibe la capacidad de las mismas para vencer las barreras peritoneales del hospedador, es decir, las larvas normales presentan mecanismos que se oponen a las defensas de los macrófagos (BARRIGA y CARRILLO, 1.987); c) el extracto particulado larvario en adyuvante completo de Freund, incrementa la carga parasitaria de una infestación (BARRIGA y CARRILLO, 1.987).

5.4.- PROTECCION CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1

5.4.1.- VIDA MEDIA DEL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1

Hemos estudiado la vida media del anticuerpo monoclonal TC-1, ensayado posteriormente en pruebas de protección pasiva, inoculándolo en el torrente sanguíneo de dos conejos. Investigamos su presencia en el suero extraído diariamente de estos animales. Al principio, observamos valores de D.O.₄₉₂ muy elevados, del orden de 1,347 a los 1,5 días (frente al 1,843 obtenido con el control positivo -anticuerpo monoclonal TC-1), que fueron descendiendo paulatinamente, hasta que a los 9,5 días p.i. el valor medio de D.O.₄₉₂ (0,277) vino a ser ligeramente superior al doble de la D.O. observada con el suero de conejo control negativo (0,104).

Esta vida media del anticuerpo monoclonal TC-1 (IgG), de 9,5 días, coincide totalmente con los resultados de HARRISON y PARKHOUSE (1.986) que estudiando la vida media de cuatro anticuerpos monoclonales frente a oncosferas de T. saginata, en el torrente sanguíneo de terneros, observan que entre los anticuerpos probados, los de clase IgM tienen una vida media de 4-5 días y los de clase IgG de 8-10 días.

5.4.2.- PRUEBAS DE PROTECCION PASIVA

Se administraron por vía I.P. 15 ug del anticuerpo monoclonal TC-1 dividiendo a los animales en tres lotes: el lote B1 control sólo recibió huevos embrionados V.O., el lote B2 recibió el anticuerpo monoclonal 24 horas antes de la inoculación de huevos y el lote B3 recibió simultáneamente los huevos por V.O. y el anticuerpo monoclonal por vía I.P..

La carga parasitaria total en el lote B2 mostró un porcentaje de reducción del 50,95% respecto al lote control B1, mientras que en el lote B3 no se apreció reducción en el número total de larvas recuperadas.

En lo que respecta a la distribución larvaria por órganos, la del lote B2 fue aparentemente similar la del lote control, aunque presentó diferencia estadística significativa en la carga cerebral (10,02% frente a

14,43%), en el porcentaje larvario en la canal (40,87% frente a 32,43%) y en la retención hepática (47,55% frente a 50,96%). En el lote B3 las diferencias en la distribución por órganos fueron mucho más patentes. Se observó un marcado aumento en la recuperación larvaria hepática, (con un 21,29% de larvas por encima del porcentaje de larvas en hígado del lote control), mientras que el resto de las localizaciones presentaron una reducción sistemática en el porcentaje larvario con porcentajes de reducción del 35,29%; 42,96% y 47,36% respectivamente para pulmones, canal y cerebro.

Se han realizado ensayos de transferencia pasiva mediante anticuerpos monoclonales en otros modelos experimentales y con porcentajes de reducción variables, pero comparables a los obtenidos por nosotros.

En S. mansoni, GRZYCH y col. (1.982) consiguen una protección del 27-58% si la administración se hace cuatro horas a.i. y del 53-62% si se administran cuatro horas p.i.; ZODDA y col. (1.982) reducen la carga parasitaria en un 39-55% cuando los administran 24 horas a.i. y dos días p.i.; HARN y col. (1.984) estudian el papel protector de un anticuerpo monoclonal frente a huevos de S. mansoni, consiguiendo unos porcentajes de reducción del 57 al 88% cuando se administra 24 horas a.i.; TARRAB-HAZDAI y col. (1.985) prueban dos anticuerpos monoclonales frente a esquistosómulas de S. mansoni inyectándolos a las 18 horas a.i., en el momento de la infestación y a los cinco días p.i., consiguiendo reducción del 35 al 36%; VERWAEDDE y col. (1.987) inyectando una hora antes de la infestación con cercarias de S. mansoni, consiguen protección entre el 43 y el 64%; también GREGOIRE y col. (1.987) consiguen un 40% de protección al administrar el anticuerpo monoclonal 24 horas a.i. y dos días p.i., o a los ocho días p.i..

En B. malayi, HAQUE y col. (1.983) obtiene una reducción significativa (70%) de microfilarias circulantes en el modelo murino cuando administra un anticuerpo monoclonal frente a este parásito.

En T. spiralis, ORTEGA PIERRES y col. (1.987) administrando un anticuerpo monoclonal durante tres días consecutivos, consiguen en modelo murino, reducción (36-51%) en la proporción de larvas recuperadas mediante digestión.

En T. saginata, HARRISON y PARKHOUSE (1.986) ensayan en terneros la protección pasiva proporcionada por anticuerpos monoclonales frente a oncosferas de este parásito, administrándolos 24 horas a.i. y observan un porcentaje de reducción del 33,49%.

En nuestro modelo, la administración del anticuerpo monoclonal TC-1 a las 24 horas a.i. indujo una protección del 50,95%. En cambio la inoculación simultánea (aunque por distintas vías) de huevos y monoclonal no protegió en términos de carga parasitaria total. Por otro lado, en la distribución larvaria por órganos, llama la atención el hecho de que en los animales tratados 24 horas a.i., fuera similar a la que presentaron los testigos, mientras que el porcentaje de reducción fue muy elevado. Presumiblemente, la distribución general de los anticuerpos durante el periodo preinoculación no consiguió un nivel hepático suficiente como para afectar a la movilidad larvaria provocando su retención en el órgano, mientras que el contacto prolongado, cooperando con la propia respuesta inmune del hospedador, podría ser el responsable de la protección.

En los animales inoculados simultáneamente con huevos y monoclonal, observamos una retención hepática importante, similar a la que se obtiene en pruebas de inmunización activa (NICHOLAS y col. 1.984). Esto puede atribuirse a la coincidencia en el hígado de una alta concentración de anticuerpos y larvas en migración, lo que provocaría una disminución de la actividad larvaria, que unido a la reacción inflamatoria, las dejaría retenidas en dicho órgano.

2
3
4

5.5.- OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO FRENTE AL ANTICUERPO MONOCLONAL TC-1

El conocimiento actual de la red idiotípica y su importancia en la regulación de la respuesta inmunitaria, nos ha llevado a diseñar un protocolo para la obtención de anticuerpos anti-idiotipo, con el fin de estudiar su posible utilización en el campo del diagnóstico y la protección de la toxocarosis.

En lo que se refiere al diagnóstico, en el síndrome de L.M.V., éste se viene realizando en los últimos años mediante E.L.I.S.A. con antígeno E/S larvario, con el inconveniente de la difícil obtención del mismo. La posible utilización de anticuerpos anti-idiotipo que mimeticen epítomos de este antígeno, simplificaría notablemente la producción del reactivo necesario para las pruebas de diagnóstico.

Por otro lado, la inmunidad efectiva frente a la mayoría de los parásitos no parece un objetivo fácil dada la inmensa variedad y complejidad de los sistemas antigénicos y los mecanismos de evasión desarrollados por los parásitos. Dentro de los distintos sistemas antigénicos, los de naturaleza proteica se consideran normalmente como buenos inmunógenos pero poco protectores, por presentar frecuentemente cambios en su composición. Sin embargo los antígenos hidrocarbonados, que no se ven sometidos a estos cambios, son malos inmunógenos "per se", además de no ser susceptibles de obtención por técnicas de DNA recombinante. Por ello, en los últimos años se ha visto impulsado el diseño de experiencias que apuntan la posibilidad de inmunización frente a parásitos utilizando anticuerpos anti-idiotipo.

GRZYCH y col. (1.985) consiguen una marcada protección frente a S. mansoni (50-80%) con un anticuerpo anti-idiotipo obtenido frente a un anticuerpo monoclonal específico para un antígeno de naturaleza glicoproteica. También consiguen buenos niveles de protección de esta manera SACKS y col. (1.982), STEIN y SÖDERSTROM (1.984) y KRESINA y OLDS (1.989). En el caso del virus Sendai, la utilización de anticuerpos anti-idiotipo es incluso más efectiva que la infestación natural, a la hora de inducir una respuesta protectora "in vivo" (ERTL y col. 1.984).

En el caso de la toxocarosis, nuestros intentos de inmunización con extractos antigénicos de adultos y antígeno E/S, no han aportado datos positivos. Tampoco son muchos ni completos los éxitos obtenidos por otros autores en sus intentos, tal y como revisamos en el apartado 5.3.. Sin embargo, nuestras experiencias de protección pasiva con el anticuerpo monoclonal TC-1, arrojaron más esperanzas (50% de protección). Por todo ello, hemos creído interesante abordar la obtención de anticuerpos anti-idiotipo frente a este mismo anticuerpo monoclonal TC-1, como hacen GRZYCH y col. (1.985) al obtener un anti-idiotipo frente al monoclonal IPLSm1 que previamente había resultado eficaz en ensayos de protección pasiva (27-62%), siendo del mismo modo específico frente a un antígeno glicoproteico de S. mansoni.

5.5.1.- OBTENCION DEL SUERO ANTI-IDIOTIPICO

Como primer paso para la obtención de anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) frente al anticuerpo monoclonal TC-1 (Ab1), procedimos a la preparación del mismo para su utilización como inmunógeno. Puesto que la región variable de toda inmunoglobulina, cuya constitución antigénica forma el idiotipo, se localiza en los fragmentos Fab, realizamos un tratamiento de digestión péptica que consiguiera la escisión de la molécula en los fragmentos $F(ab')_2$ y pFc' .

Para caracterizar el producto de la digestión se utilizó electroforesis en SDS-PAGE. Analizamos alícuotas de la muestra digerida ($t=final$) y de la muestra sin digerir ($t=0$), en geles del 10% en condiciones no reductoras y del 12,5% en condiciones reductoras, (Fotos 7 y 8 respectivamente). La presencia de los fragmentos $F(ab')_2$ queda claramente reflejada en las bandas situadas a unos 110 KD y 25 KD de las calles B, en los geles del 10% y el 12,5% respectivamente. Por otro lado, detectamos una porción de muestra sin digerir en las bandas situadas a unos 150 KD en condiciones no reductoras y a unos 51 KD (cadenas pesadas completas) en condiciones reductoras, de las calles B de los mismos geles, así como porciones de fragmentos pFc' representados por la banda situada a unos 15 KD de la calle B en el gel del 12,5%.

Con el fin de purificar los fragmentos $F(ab')_2$, filtramos la muestra procedente de la digestión, por una columna de ultragel ACA-44. Seleccionamos las fracciones comprendidas entre el tubo número 16 y el tubo número 21 inclusivos, abarcando los puntos de la campana representada en la figura 65, asegurando así la eliminación de todas las fracciones de bajo peso molecular. A continuación caracterizamos las fracciones purificadas procesándolas en un gel del 10%, en condiciones no reductoras y reductoras. Se observó por una parte la eliminación de los fragmentos de bajo peso molecular y por otra, la presencia en ambos casos de una porción del mismo sin digerir (Foto 9): bandas a unos 150 KD situadas en las calles A, B y C para condiciones no reductoras y bandas a unos 51 KD (cadenas pesadas completas) en las calles D, E y F para condiciones reductoras.

A la vista de los resultados anteriores estimamos conveniente proceder a la redigestión de la muestra. Para ello, mezclamos primero las dos fracciones seleccionadas (T16 y P), concentrándolas por centrifugación mediante sistema Amicon Centriprep 30. Tras dializar frente a tampón de digestión, tratamos de nuevo con pepsina siguiendo la metodología descrita, obteniendo finalmente 1,954 mg de proteína. Por último volvimos a caracterizar la muestra mediante SDS-PAGE al 10% en condiciones no reductoras y reductoras. Se observó en esta ocasión su total digestión, como se refleja en las bandas situadas a unos 110 KD en condiciones no reductoras y a unos 25 KD en condiciones reductoras (Foto 10).

De los trabajos consultados, observamos que existen dos tendencias en la preparación del anticuerpo monoclonal para utilizarlo como inmunógeno en la obtención de anticuerpos anti-idiotipo: En la primera se trata tan sólo de una purificación a partir del fluido ascítico correspondiente, sin someterlo a fraccionamiento enzimático. SACKS y col. (1.982) obtienen anticuerpos anti-idiotipo frente a tres anticuerpos monoclonales que reconocen tres antígenos de T. rhodesiense, purificando dichos monoclonales mediante cromatografía de afinidad en columna de Proteína A-Sepharosa 4B. VELGE-ROUSSEL y col. (1.984) obtienen anticuerpos anti-idiotipo frente a un anticuerpo monoclonal que reconoce antígenos de S. mansonii, preparando el inmunógeno por tres procedimientos: precipitación del anticuerpo monoclonal copolimerizado con inmunoglobulinas IgG humanas con un 25% de glutaraldehído, a partir de células secretoras del anticuerpo monoclonal fijadas con un 25% de glutaraldehído y mediante precipitación del mismo

anticuerpo monoclonal con sulfato amónico. KRESINA y OLDS (1.988) obtienen antisuero anti-idiotípico a partir de un anticuerpo monoclonal que reconoce una glicoproteína presente en un extracto de adultos de S. mansoni. Purifican el monoclonal a partir de las ascitis mediante precipitación con sulfato amónico y mediante cromatografía en columna CL6B.

En la segunda tendencia, además de la purificación anterior, se recurre a la fragmentación enzimática. Así PALOMO y col. (1.990) obtienen anticuerpos anti-idiotipo frente a anticuerpos monoclonales que reconocen diversos antígenos del virus sincitial respiratorio humano, preparando el inmunógeno por un procedimiento muy similar al nuestro. Purifican los anticuerpos del fluido ascítico correspondiente mediante cromatografía con Proteína A-Sepharosa, mientras que nosotros la hacemos precipitando con ácido caprílico y sulfato amónico. A continuación y al igual que nosotros, los digieren con pepsina, separando después los fragmentos $F(ab')_2$ generados de los péptidos pequeños, mediante diálisis con una membrana cuyo tamaño de poro proporciona un límite de exclusión de 50 KD. En nuestra opinión, la obtención de fragmentos $F(ab')_2$ para su posterior utilización como inmunógenos, es conveniente aunque no indispensable, puesto que se reduce la respuesta anti-isotópica, facilitando por tanto la posterior purificación del suero anti-idiotípico.

Las pautas de inmunización tienen como denominador común la administración de una primera dosis de inmunógeno en adyuvante completo de Freund, normalmente por vía S.C., y de un número variable de recuerdos en adyuvante incompleto de Freund. En el caso de la inmunización en conejos, la primera dosis oscila entre 400 ug, como en nuestro caso, y 5 mg (KRESINA y OLDS, 1.988); mientras que los recuerdos varían entre los 100 ug de PALOMO y col. (1.990), dosis muy similar a los 150 ug utilizados por nosotros, y los 5 mg de KRESINA y OLDS (1.988). Respecto a la vía de administración, PALOMO y col. (1.990) emplean, al igual que nosotros, la vía I.D. en múltiples sitios del lomo del animal para la primera dosis, y la vía I.M. para los recuerdos. Sin embargo KRESINA y OLDS (1.988) utilizan la vía S.C. en ambos casos.

En cuanto los tiempos elegidos para el sangrado de los animales también son muy variados. En nuestro caso realizamos una primera toma de sangre inmediatamente después de la administración del primer recuerdo, con

objeto de disponer de una muestra preliminar de suero que nos permitiera monitorizar el curso inicial de la respuesta. Posteriormente efectuamos un total de cuatro sangrados.

5.5.2.- PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO

5.5.2.1.- ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ANTI-ISOTIPICA Y ANTI-IDIOTIPICA

En esta primera parte del trabajo de purificación y caracterización del suero anti-idiotípico, hemos procesado la muestra preliminar de suero obtenido tras la primera dosis inmunizante y el suero procedente del primer sangrado, en los dos conejos utilizados en la experiencia. Con objeto de eliminar al máximo la posible actividad anti-isotípica en los sueros, éstos se purificaron parcialmente mediante cromatografía de afinidad, adsorbiéndolos con inmunoglobulinas de ratón acopladas a una columna de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno. Una metodología similar utilizan GOFFAN KEUTNER y col. (1.972), SACKS y col. (1.982), y PALOMO y col. (1.990).

Una vez realizado el primer paso por la citada columna, ensayamos la actividad anti-isotípica remanente, enfrentando los sueros en E.L.I.S.A. a 5 ug/ml de inmunoglobulinas de ratón. Observamos que a bajas diluciones, la muestra preliminar de suero extraída de ambos conejos, mostraba una clara actividad anti-isotípica, siendo por otra parte, casi el doble en el caso del conejo 2 respecto al conejo 1. A medida que nos desplazamos hacia diluciones más altas, la actividad anti-isotípica en el suero del conejo 1 fue disminuyendo rápidamente, hasta que a la dilución 1/8.000 ya no se detectó mediante esta técnica (D.O. = 0,129). El suero del conejo 2, sin embargo, continuó mostrándose bastante reactivo, y a la misma dilución (1/8.000) siguió revelando una D.O. elevada (1,105). El mismo ensayo, con los sueros del primer sangrado, presentó resultados similares al anterior, con mayor reactividad del suero del conejo 2.

Paralelamente, con estos mismos sueros parcialmente purificados, ensayamos la actividad frente a su anticuerpo idiotípico (Ab1)

correspondiente (TC-1) y frente a otro anticuerpo monoclonal relacionado (TC-2). Tanto en el caso de la muestra preliminar de suero, como del suero procedente del primer sangrado, observamos una clara actividad específica frente al Ab1 en ambos conejos. En las figuras 67 y 68, representamos conjuntamente la actividad anti-isotópica y anti-idiotípica de las muestras preliminares de suero y en las figuras 70 y 71 reflejamos las mismas actividades para los sueros procedentes del primer sangrado. En ellas podemos observar que la actividad específica frente al idiotipo (TC-1) fue siempre muy superior a la actividad anti-isotópica frente a inmunoglobulinas de ratón (aproximadamente 15 veces). Por otra parte, el suero anti-idiotípico mostró un cierto grado de reacción cruzada con el anticuerpo monoclonal TC-2, lo cual podría indicar que TC-1 y TC-2 reconocen epítomos relacionados o posiblemente solapados. Esto a su vez coincide con el hecho de que en estudios previos de inmunoprecipitación (AGUILA y col. 1.988) ambos monoclonales reconocen la misma banda en SDS-PAGE.

A la vista de los resultados anteriores, seleccionamos el suero procedente del primer sangrado del conejo 1 para continuar nuestro trabajo, por presentar una clara actividad anti-idiotípica y mucha menos actividad anti-isotópica que el suero del conejo 2. Procedimos a una nueva purificación parcial, adsorbiéndolo con inmunoglobulinas de ratón acopladas a columna de Sepharosa 4B y finalmente aislamos la fracción IgG de este suero, mediante paso por columna de proteína A-Sepharosa 4B.

Respecto a las técnicas utilizadas por los distintos autores consultados, en la evaluación de las actividades anti-isotópica y anti-idiotípica, observamos una gran variedad en las mismas. Así por ejemplo SACKS y col. (1.982) emplean la hemaglutinación para estudiar ambas actividades, mientras que KRESINA y OLDS (1.988) utilizan la precipitación en OUCHTERLONY (1.953). La técnica empleada con más frecuencia es E.L.I.S.A. (KIM y col., 1.989; PALOMO y col., 1.990), utilizándose también E.L.I.S.A. "dot" (VELGE-ROUSSEL y col., 1.988).

Todos comprueban la eliminación de la actividad anti-isotópica, siendo la adsorción de los sueros con inmunoglobulinas de ratón (mediante cromatografía de afinidad) el procedimiento más común utilizado con este fin. Algunos, al igual que nosotros, aíslan además la fracción IgG del suero anti-idiotípico (SACKS y col., 1.982) y otros como PALOMO y col.

(1.990) alcanzan un grado más de puificación, adsorbiendo el suero anti-idiotípico con el Abl específico acoplado a columna de afinidad. Como en nuestro caso, KRESINA y col. (1.988) detectan una gran variabilidad en la respuesta de los animales utilizados, pues de los tres conejos inmunizados inicialmente, sólo en uno de ellos detectan una respuesta anti-idiotípica específica. En nuestra experiencia, la variabilidad entre los animales empleados se reflejó fundamentalmente a nivel de la actividad anti-isotípica.

Por otro lado, en las pruebas de caracterización, PALOMO y col. (1.990) confirman la idea anteriormente apuntada por nosotros sobre la ventaja de utilizar fragmentos $F(ab')_2$ para la obtención de anticuerpos anti-idiotipo. Obtienen los sueros deseados, bien mediante inyección de fragmentos $F(ab')_2$ del monoclonal utilizado, bien mediante inoculación del anticuerpo completo. Cuando enfrentan los sueros al idiotipo correspondiente, observan que el título en los conejos inmunizados con el monoclonal completo es menor que en los conejos inoculados con los fragmentos $F(ab')_2$ purificados. Esto indica, según los citados autores, el aumento de determinantes idiotípicos específicos en el material tratado con pepsina, frente al total de determinantes antigénicos presentes en la molécula de inmunoglobulina.

5.5.2.2.- ESTUDIO DE LA SEMEJANZA ESTRUCTURAL ENTRE LOS ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO Y EL ANTIGENO EXCRETOR-SECRETOR LARVARIO

El siguiente nivel de caracterización, consistió en el estudio de la semejanza estructural entre los anticuerpos anti-idiotipo y el antígeno E/S. Este se realizó principalmente por dos vías: mediante ensayos de inhibición en la unión del anticuerpo idiotípico al antígeno E/S y mediante la inducción de la formación de anticuerpos anti-anti-idiotipo (Ab3).

5.5.2.2.1.- Estudios de inhibición de la unión del anticuerpo idiotípico al antígeno excretor-secretor larvario

Los estudios de inhibición de la unión del anticuerpo idiotípico (TC-1) al antígeno E/S, se realizaron mediante dos tipos de ensayos:

E.L.I.S.A. y microprecipitación larvaria. Respecto al primero y en la prueba inicial, comprobamos una clara inhibición en la unión del anticuerpo monoclonal TC-1 a su antígeno específico, ya desde la primera de las concentraciones ensayadas: a 3 ug/ml de TC-1 y dilución 1/2 del reactivo anti-idiotípico, observamos un 66,32% de inhibición (Tabla CXVII y Figura 74). En un segundo ensayo, utilizamos el anticuerpo idiográfico a concentraciones superiores para determinar en que momento se producía la inhibición. Para una dilución constante del reactivo anti-idiotípico de 1/2, empezando por una concentración de TC-1 de 15 ug/ml, observamos una clara inhibición entre 3,75 ug/ml y 1,87 ug/ml de este último (pasando de un 20,64% a un 90,46% respectivamente, Tabla CXIX).

Posteriormente ensayamos el reactivo anti-idiotípico a distintas diluciones (desde 1/3 a 1/48) frente a las concentraciones anteriores del anticuerpo idiográfico: observamos que a medida que diluimos el suero, la inhibición se produce a concentraciones más bajas del anticuerpo monoclonal (Tablas CXX a CXXV). Así por ejemplo, a la dilución 1/3 se observó la inhibición entre 3,75 ug/ml y 1,87 ug/ml (pasando de un 0% a un 88%) y a la dilución 1/48, la inhibición se produjo entre 0,23 ug/ml y 0,11 ug/ml (pasando de un 46,89% a un 88,61%).

En el segundo tipo de E.L.I.S.A. de inhibición empleado, incubamos el anticuerpo idiográfico marcado con biotina a concentración constante, con diluciones seriadas dobles de: fracción IgG del suero anti-idiotípico, antígeno E/S y suero negativo de conejo. Se observó, como cabía esperar, que el antígeno E/S dió lugar a inhibiciones superiores al 98% en todas las concentraciones estudiadas (desde 3 ug/ml hasta 0,04 ug/ml, Tabla CXXVIII). Por otro lado, la fracción IgG del suero anti-idiotípico fue capaz de desplazar totalmente la unión del idiograma a su antígeno específico, a concentraciones superiores a 6 ug/ml (Tabla CXXIX). Como control de este ensayo se estudió la unión inespecífica de un suero negativo de conejo, observando aproximadamente un 30% de inhibición en la unión a las máximas concentraciones estudiadas (Tabla CXXVII, Figuras 80 y 81).

Ensayos similares para evaluar la capacidad de inhibición, son realizados por GRZYCH y col. (1.985), PALOMO y col. (1.990) y KRESINA y OLDS (1.989). PALOMO y col. (1.990) realizan ensayos de inhibición mediante E.L.I.S.A. tapizando con el virus sincitial respiratorio humano, siguiendo

una metodología similar a la desarrollada por nosotros en el segundo de nuestros ensayos de inhibición. Observan que todos los sueros anti-idiotípicos obtenidos contienen anticuerpos que inhiben significativamente la unión del Abl al citado virus, lo que demuestra que pertenecen al tipo Ab2B. Sin embargo KRESINA y OLDS (1.989) utilizando un R.I.A. en fase sólida para valorar la presencia de Ab2B en el suero anti-idiotípico de conejo obtenido frente al anticuerpo monoclonal (Abl) 31-3B6, observan que sólo una pequeña población de los anticuerpos anti-idiotipo presentes en el suero de conejo es capaz de mimetizar al antígeno, pues 5 ug de éste consiguen inhibir, tan sólo a un nivel del 5%, la unión de los anticuerpos anti-idiotipo a su Abl correspondiente.

De los resultados obtenidos en la secuencia de ensayos realizados, se desprende la capacidad de competición del suero anti-idiotípico con el antígeno E/S por la unión con el anticuerpo monoclonal TC-1 en medio líquido, o lo que es lo mismo, la capacidad del anticuerpo anti-idiotipo para bloquear el sitio de unión del idiotipo correspondiente (TC-1) al antígeno E/S. Todo parece indicar claramente, la presencia en el suero obtenido de anticuerpos del tipo Ab2B, es decir, de anticuerpos inducidos por el paratopo, y por tanto estructuralmente relacionados con el epítopo reconocido por TC-1 en el antígeno E/S.

Para confirmar la existencia de los anticuerpos del tipo Ab2B en el suero estudiado, empleamos la técnica de microprecipitación larvaria. Mediante la misma, y al igual que en los ensayos de E.L.I.S.A. de inhibición anteriormente descritos, evaluamos la capacidad de competición entre el suero anti-idiotípico y el antígeno E/S, por la unión al idiotipo correspondiente (TC-1). Sin embargo, este sistema presenta la ventaja de que el Ab2 competiría con el antígeno producido por las larvas "in vitro" en el mismo medio y en el momento del ensayo. En una primera experiencia, incubamos previamente el reactivo anti-idiotípico, a una dilución final de 1/2, con su idiotipo correspondiente (TC-1) o con el otro anticuerpo monoclonal relacionado (TC-2), en un rango de concentración desde 350 ug/ml a 2,75 ug/ml y con sueros murinos positivo y negativo, en un rango de diluciones desde 1/2 a 1/256. A continuación enfrentamos el producto de la incubación y los reactivos citados, a las larvas vivas. Se observó que la inhibición tuvo lugar a la última de las diluciones ensayadas de TC-1. Respecto a TC-2, observamos que no tuvo la misma capacidad de inhibición de la

microprecipitación. Por otra parte, los sueros murinos estudiados no se vieron afectados por la presencia de Ab2 en el ensayo.

A la vista de los resultados anteriores, variamos el rango de concentración de TC-1 desde 20 ug/ml a 0,03 ug/ml, volviendo a observar claramente la inhibición de la microprecipitación a concentraciones inferiores a 2,5 ug/ml. En esta ocasión, el suero murino positivo utilizado como control, tampoco vió alterada su reactividad frente al antígeno E/S por la presencia de Ab2. Esto indicaría que la reactividad de los anticuerpos específicos presentes en el suero policlonal positivo, y no secuestrados por Ab2 (representante de un sólo epítipo), fue suficiente para que tuviera lugar la microprecipitación. Los datos anteriores son confirmatorios en un sistema natural de producción del antígeno E/S de T. canis, de la actividad anti-idiotípica del suero estudiado, y nos permitieron clasificarlo definitivamente como β o "imagen interna", para su potencial utilización en pruebas de inmunodiagnóstico.

5.5.2.2.2.- Inducción de la formación de anticuerpos anti-anti-idiotipo

Continuando con los estudios de caracterización del suero anti-idiotípico obtenido, investigamos la capacidad de producción de anticuerpos anti-anti-idiotipo (Ab3) que reprodujeran las características del Ab1 inicial a nivel de reconocimiento antigénico. Para ello, inoculamos un conejo con un preparado de Ab2 correspondiente a la fracción IgG completa. El suero recolectado se estudió en E.L.I.S.A. frente al antígeno E/S, para comprobar la capacidad de reconocimiento del mismo. Como reflejamos en la Figura 82, el suero anti-anti-idiotípico mostró una reactividad específica frente al antígeno E/S, observándose una subida en el título del suero procedente del primer sangrado respecto a la muestra preliminar de suero.

PALOMO y col. (1.990) obtienen cuatro sueros anti-anti-idiotípicos diferentes frente a los cuatro anti-idiotipos previamente caracterizados, determinando que sólo uno de ellos (Ab3) es capaz de reconocer en E.L.I.S.A. al virus sincitial respiratorio humano, presentando además capacidad neutralizante sobre el virus infectante. GRZYCH y col. (1.985) caracterizan el suero anti-anti-idiotípico (Ab3) obtenido en conejos, por su

capacidad para inhibir la unión del Ab1 a su antígeno mediante R.I.A., detectando en ambos (Ab1 - Ab3) una especificidad muy próxima por el mismo epítipo. KRESINA y OLDS (1.988), al ensayar la capacidad de protección del suero anti-idiotípico obtenido, detectan mediante E.L.I.S.A., la presencia de Ab3 en el curso de la respuesta humoral de los animales vacunados.

5.5.2.2.3.- Posible utilización de los anticuerpos anti-idiotipo como réplica idiotípica del antígeno excretor-secretor larvario

Un vez comprobada la presencia de Ab2B en el suero anti-idiotípico, nos planteamos la posibilidad de que fueran utilizables como réplica antigénica del antígeno E/S en E.L.I.S.A. diagnóstico. En un primer paso, ensayamos la actividad de sueros murinos positivos, a distintas diluciones y seleccionados al azar, en E.L.I.S.A. tapizando con la fracción IgG del suero anti-idiotípico a 10 ug/ml. Comprobamos que utilizando la dilución 1/50, los sueros ensayados alcanzaron aproximadamente dos veces la señal del suero murino utilizado como control negativo. En un segundo ensayo doblamos la concentración del tapizado, no observando mejoras significativas en los resultados obtenidos. Además, en este mismo ensayo y utilizando como tapizado la fracción IgG de un suero de conejo negativo, no se observó una reactividad comparable a la de los sueros murinos positivos frente al Ab2, a la dilución 1/50.

Estos primeros resultados pueden interpretarse como la comprobación de que los anticuerpos anti-idiotipo pueden, inicialmente, sustituir al antígeno E/S en el inmunodiagnóstico, aunque en este nuevo modelo debe redefinirse el criterio de interpretación que se estableció en su momento para el E.L.I.S.A. diagnóstico con antígeno E/S. Además, es necesario purificar los anticuerpos específicos de este reactivo anti-idiotípico a fin de aumentar la sensibilidad de la prueba, antes de utilizarlos como método diagnóstico.

Buscando un sistema alternativo ensayamos un nuevo protocolo, empleando un E.L.I.S.A. de inhibición para aumentar la sensibilidad de la técnica. La presencia de anticuerpos específicos se evaluó en este caso mediante el porcentaje de inhibición de la unión de TC-1 al suero anti-idiotípico, tras una incubación con los sueros murinos ensayados. Los

resultados obtenidos con dos sueros murinos positivos elegidos al azar (procedentes de la séptima y novena semana p.i. con 1.000 huevos embrionados de T. canis), mostraron porcentajes de inhibición, respecto a suero control negativo, de un 50% como máximo. Esto indica que el ensayo de inhibición resulta más sensible en la detección de anticuerpos específicos para el epítipo del antígeno E/S reconocido por TC-1 y reproducido por los anticuerpos anti-idiotipo. No obstante, y por ser sueros elegidos al azar, sólo representan un momento puntual en el curso de la respuesta humoral de los animales. Por ello, diseñamos otro ensayo en el que pudiéramos detectar la aparición de anticuerpos específicos para el epítipo señalado, a lo largo de una infestación de doce meses de duración.

En este estudio, investigamos la dinámica de aparición de anticuerpos específicos en la cepa murina BALB/c (tras la inoculación con 1.000 huevos embrionados de T. canis) en dos fases: primero detectamos anticuerpos específicos frente al antígeno E/S completo, mediante E.L.I.S.A. directo, y a continuación, detectamos los anticuerpos frente al epítipo de este mismo antígeno reconocido por TC-1, mediante E.L.I.S.A. de inhibición.

En la primera fase, determinamos la aparición de IgM e IgG específicas. Las primeras fueron detectables desde la primera semana p.i. con una brusca subida a la segunda semana p.i.. Se mantuvieron elevadas durante todo el estudio, si bien desde la cuarta semana p.i. y hasta el final, permanecieron siempre por debajo de las IgG. Estas últimas, se hicieron patentes desde la segunda semana p.i., y fueron aumentando progresivamente hasta alcanzar el máximo a los 10 meses p.i.. Estos resultados son comparables a los obtenidos por BOWMAN y col. (1.987): en ratones BALB/c detectan, al igual que nosotros, IgM desde la primera semana p.i., con un máximo a las 3-6 semanas p.i., lo cual no coincide con el máximo observado por nosotros (9-10 meses p.i.), quizá porque su estudio se realizó tan sólo hasta la semana 26 p.i.. En cuanto a los niveles de IgG, estos autores comienzan a detectarlos igualmente a la segunda semana p.i., observando el máximo entre la sexta y octava semana p.i., mientras que nosotros detectamos los máximos valores a partir de los nueve meses, igual que para las IgM.

En la segunda fase, ensayo de inhibición, observamos un primer periodo de latencia de tres semanas en la aparición de anticuerpos específicos para

el epítopo reconocido por TC-1. A partir de este momento detectamos un incremento brusco en la tasa de anticuerpos, apreciando porcentajes de inhibición significativos (superiores al 30%) a partir de la quinta semana p.i.. Los niveles de anticuerpos fueron aumentando suavemente desde la sexta semana p.i. alcanzando el máximo a los nueve meses (45% de inhibición), manteniéndose elevados hasta el final de la experiencia.

La dinámica de la respuesta humoral específica frente al epítopo reconocido por TC-1, se diferencia de la respuesta IgG e IgM específica frente a la totalidad del antígeno E/S, en la presencia de un periodo de tres semanas de latencia. Por otra parte coincide en que en todas las determinaciones se alcanzaron los niveles máximos de anticuerpos a partir de los nueve meses p.i., manteniéndose elevados hasta el final de la experiencia. Los datos anteriores parecen indicar que la respuesta humoral específica frente al epítopo reconocido por TC-1 es básicamente del tipo IgG, como demuestra su tardía aparición en el tiempo.

ROBERTSON y col. (1.988) realizan un estudio similar mediante un ensayo de inhibición utilizando dos anticuerpos monoclonales, Tcn-2 y Tcn-3, (MAIZELS y col. 1.987). La diferencia entre nuestro ensayo y el de estos autores radica en que mientras que ellos utilizan para el tapizado antígeno E/S nosotros empleamos suero anti-idiotípico. Determinan la aparición, en suero de conejos, de anticuerpos específicos para los epítomos del antígeno E/S reconocidos por los citados monoclonales. Los anticuerpos dirigidos frente al epítopo reconocido por Tcn-2 (IgM) son claramente positivos a los 14 días p.i., manteniéndose a niveles máximos hasta el día 42 p.i., para descender posteriormente y hacerse indetectables a partir del día 70 p.i.. En cuanto a los anticuerpos dirigidos frente al epítopo reconocido por Tcn-3 (IgG), se detectan a partir de la cuarta semana p.i., elevándose bruscamente a la quinta semana p.i. (nivel máximo) y manteniéndose altos hasta el final de su experiencia de 14 semanas de duración. Estos resultados son muy semejantes a los nuestros cuando detectamos anticuerpos específicos frente al epítopo reconocido por otro anticuerpo monoclonal (TC-1) también de clase IgG. El periodo de latencia coincide en tres semanas, nuestro máximo apareció sin embargo mucho más retrasado en el tiempo (nueve meses frente a la quinta semana p.i. de estos autores) y del mismo modo los niveles detectados se mantuvieron elevados hasta el final de la experiencia.

De ambos trabajos podemos concluir que la respuesta de anticuerpos específicos frente a distintos epítomos del antígeno E/S (reconocidos por Tcn-2 y Tcn-3 -MAIZELS y col. 1.987- y reconocidos por TC-1 -AGUILA y col. 1.988-) demuestra que existen diferencias en la aparición de los mismos pero que en conjunto contribuyen a una respuesta global continua en el tiempo.

En esta línea de aplicación de anticuerpos anti-idiotipo en el campo del diagnóstico clínico, KIM y col. (1.989) ponen a punto un E.L.I.S.A. de inhibición utilizando anticuerpos anti-idiotipo monoclonales para la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg). Consiguen la detección de antígeno en suero a través de la capacidad del mismo para inhibir la unión del anticuerpo monoclonal 8D-3-6 (Abl específico para este antígeno) a los anticuerpos anti-idiotipo monoclonales obtenidos frente a este Abl. Mediante este ensayo detectan antígeno en un rango de 10 ng/ml a 1 ug/ml, consiguiendo además resultados que se correlacionan a un buen nivel con los obtenidos en R.I.A..

De todo lo anterior, se desprende la posible utilidad del reactivo anti-idiotípico como réplica antigénica del antígeno E/S. No obstante para una posible aplicación en diagnóstico sería necesario disponer de una réplica antigénica en la que se encontraran representados los epítomos inmunodominantes. Para ello cabría la posibilidad de obtener un suero anti-idiotípico frente a un suero policlonal específico. Sin embargo lo ideal sería disponer de todos los anticuerpos anti-idiotipo monoclonales necesarios para mimetizar los epítomos más representativos del antígeno E/S.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

- 1) - El estudio de la migración larvaria de T. canis en modelo murino revela diferencias entre las dos cepas utilizadas, BALB/c y C57BL/10, destacando la mayor lentitud larvaria, el abandono cerebral de las larvas y su retorno al hígado en C57BL/10. También se confirma la migración por rutas diferentes a la circulatoria tras la investigación de larvas en cavidad peritoneal, lo que indica que hay que reconsiderar el ciclo de T.canis en el hospedador paraténico.
- 2) - La recuperación larvaria al cabo de un año p.i. en BALB/c, revela que el número de larvas recuperadas desciende con el tiempo y que el asentamiento definitivo de T. canis en esta cepa es la canal y cerebro, con predominio poblacional en este último.
- 3) - La eosinofilia se caracteriza por la aparición de un pico eosinofílico el día 10 p.i. en la cepa BALB/c y el día 15 p.i. en la cepa C57BL/10, manteniéndose elevada durante toda la experiencia en la primera y descendiendo a valores prácticamente basales en la segunda, lo que indica que también la cepa murina condiciona este parámetro.
- 4) - El tratamiento con distintos preparados de mebendazol en BALB/c en fase hepato-pulmonar provoca retención hepática y disminución del número de larvas en cerebro. Mebendazol en dispersión sólida de polietilenglicol, muestra una relación directa entre dosis y retención hepática e inversa entre dosis y acceso a cerebro, así como entre dosis y reducción de la carga parasitaria total, lo que indica que dosis altas son larvistáticas y dosis bajas son larvicidas.
- 5) - El tratamiento en fase miotrópica-neurotrópica apenas afecta a la distribución por órganos mientras que resulta activo en la reducción de la carga parasitaria total y más que cuando se administra en fase hepato-pulmonar. La formulación sólida de mebendazol en polietilenglicol consigue una reducción de la dosis terapéutica.

- 6) - La evaluación del tratamiento con distintos preparados de mebendazol en BALB/c mediante el estudio de anticuerpos específicos frente al antígeno E/S y frente al antígeno total larvario, no resulta un parámetro válido para monitorizar la eficacia del mismo.
- 7) - La evaluación del tratamiento en BALB/c mediante la detección de inmunocomplejos circulantes indica que mebendazol en las distintas formulaciones ensayadas interfiere con el metabolismo larvario. El preparado comercializado como "Lomper" provoca la desaparición de inmunocomplejos específicos y la única preparación estudiada con efecto comparativo es la de mebendazol en dispersión sólida de polietilenglicol a 50 mg/kg/día.
- 8) - Los ensayos de protección en BALB/c con antígeno total de adultos y con antígeno E/S, a las dosis y con las pautas utilizadas, no consiguen reducir la carga parasitaria total, si bien el antígeno E/S interfiere en la fase miotrópica-neurotrópica de la migración favoreciendo la colonización cerebral a expensas de la población larvaria localizada en la canal.
- 9) - La vida media del anticuerpo monoclonal TC-1 en conejo, está entre 9 y 10 días. En los ensayos de protección pasiva en la cepa BALB/c con TC-1, hemos obtenido un porcentaje de reducción de la carga parasitaria superior al 50%.
- 10) - El suero anti-idiotípico obtenido es específico frente al idiotipo correspondiente (TC-1) y presenta también relación con el idiotipo presente en el anticuerpo monoclonal TC-2. En este suero suero hay una proporción elevada de anticuerpos del tipo Ab2B.
- 11) - La inmunización con el suero anti-idiotípico (Ab2) ha dado lugar a un suero anti-anti-idiotípico (Ab3) específico para el antígeno E/S, tal y como se comprueba mediante E.L.I.S.A. directo.
- 12) - El reactivo anti-idiotípico (Ab2) puede resultar útil como réplica antigénica de un epítipo del antígeno E/S empleando E.L.I.S.A. directo y de inhibición.

BIBLIOGRAFIA

7.- BIBLIOGRAFIA

- A -

- *ABE, K. (1.985).- Present status of animals transmitting zoonotic agents in Japan. Reservoir of Toxocara canis ova. Report. Jpn. Vet. Assoc., Tokyo, 1.985.
- *ABDEL-HAMEED, A.A. (1.984, a).- Effects of benzimidazole anthelmintics on the survival and migration behaviour of Toxocara canis larvae in the mouse. Am. J. Vet. Res. 45 (7): 1.430-1.433.
- *ABDEL-HAMEED, A.A. (1.984, b).- Effect of thiabendazole on the migration of Toxocara canis larvae in the mouse. J. Parasitol 70 (2): 226-231.
- *ABO-SHEHADA, M.N.; HERBERT, I.V. (1.984).- Anthelmintic effect of levamisole, ivermectin, albendazol and fenbendazole on larval Toxocara canis infection in mice. Res. Vet. Science 36 (1): 87-91.
- *ABO-SHEHADA, M.N.; AL-ZUBAIDY, B.A.; HERBERT, I.V. (1.985).- The migration of larval Toxocara canis in mice. I Migration through the intestine in primary infections. Vet. Parasitol. 17: 65-73.
- *ABO-SHEHADA, M.N.; HERBERT, I.V. (1.985).- The migration of larval Toxocara canis in mice. II-Postintestinal migration in primary infections. Vet. Parasitol. 17: 75-83.
- *ABO-SHEHADA, M.N. (1.989, a).- Prevalence of Toxocara ova in some schools and public grounds in northern and central Jordan. Ann. Trop. Med. Parasitol. 83 (1): 73-75.
- *ABO-SHEHADA, M.N.; HERBERT, I.V. (1.989, b).- Variations in innate resistance to experimental Toxocara canis infection in two strains of mice. Vet. Parasitol. 33 (3-4): 297-307.
- *AGANGA, A.O.; AGANGA, A.A.; UMOH, J.U.; KUDI, A. (1.988).- Isolation of Sarcocystis ovicanis sporocysts in dogs in Zaria area: its significance to small ruminant production. Bull. Anim. Health Prod. in Africa 36 (2): 138-140.
- *AGUILA, C.; CUELLAR, C.; FENOY, S.; GUILLEN, J.L. (1.987, a).- Comparative study of assays detecting circulating immunocomplexes and specific antibodies in patients infected with Toxocara canis. J. Helminthol. 61: 196-202.
- *AGUILA, C.; CUELLAR, C.; FENOY, S.; GUILLEN, J.L. (1.987, b).- Evaluation of chemotherapy in experimental toxocarosis by immunocomplex determination. Third Mediter. Conf. Parasitol. Jerusalem (Israel), August., :26.
- *AGUILA, C.; CUELLAR, C.; GUILLEN, J.L. (1.988).- Anticuerpos monoclonales frente al antígeno excretor-secretor de Toxocara canis. Rev. Iber. Parasitol. 48 (2): 209-220.
- *AKAO, N. (1.985).- Immune response to excretory-secretory products of second stage larvae of Toxocara canis: humoral immune response to larvae trapping in the livers of reinfected mice. Jap. J. Parasitol. 34 (4): 293-300.
- *AKAO, N.; KONDO, K.; SAKAI, H.; YOSHIMURA, H. (1.986).- An immunopathological study of the liver of mice infected with Toxocara canis. Jap. J. Parasitol. 35 (2): 135-140.
- *AL-TAE, A.R.A.; ALBASHIR, N.M.; MURAD, A.M. (1.987).- Artificial hatching of Toxocara canis larvae

using gut tissue extracts and some chemicals. J. Biol. Sci. Res. Vol. 18 (3): 47-58.

- *ANGELIS CORTES, V. de; VIANNA PAIM, G.; ANTUNES de ALENCAR FILHO, R. (1.988).- Infections by Ancylostoma and Toxocara in dogs and cats caught on the streets of Sao Paulo city, Brazil. Rev. Saude Publica 22 (4): 341-343.
- *ANGULO R.; AGUILA, C.; GUILLEN, J.L. (1.985).- Contaminación de suelos de parques públicos por Toxocara canis. Rev. Iber. Parasitol. vol. Extraordinario: 165-171.
- *ANNEN, J.M.; ECKERT, J.; HESS, V. (1.975).- A simple method for the preparation of Toxocara canis antigen for the indirect immunofluorescence test. Act. Trop. 32 (1): 38-45.
- *ANVIK, J.O.; HAGUE, A.E.; RAHAMAN, A. (1.974).- A method of estimating urban dog populations and its application to the assessment of canine fecal pollution and endoparasitism in Saskatchewan. Can. Vet. J. 15 (8): 219-223.
- *ARANDAS REGO, A. (1.980).- Contamination of the soil in parks and gardens of Lisbon by eggs of Toxocara and other helminths. Ann. Esc. Sup. Med. Vet. 22: 152-162.
- *ARENE, F.O.I. (1.984).- Prevalence of toxocariasis and echinococcosis among dogs in the Niger Delta. J. Trop. Med. Hyg. 87 (5): 207-209.
- *ARES-MAZAS, M.E.; SELA-PEREZ, M.C.; ARIAS-FERNANDEZ, M.C. (1.988).- Epidemiology of intestinal parasite infections of dogs in Galicia. Rev. Iber. Parasitol. 47 (4): 335-339.

—B—

- *BADLEY, J.G. (1.985).- Immunemediated adherence of eosinophils to Toxocara canis infective larvae and the role of exoantigens. Diss. Abs. Int. 46 (5): 1.504.
- *BADLEY, J.E.; GRIEVE, R.B.; BOWMAN, D.D.; GLICKMAN, L.T.; ROCKEY, J.H. (1.987).- Analysis of Toxocara canis larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterization and antibody recognition. J. Parasitol. 73 (3): 593-600.
- *BAILLENGER, J. (1.982).- Coprologie parasitaire el fonctionnelle. 4a Ed. Imprimerie Pechade. Burdeos.
- *BAIORINENE, D.V. (1.982).- Some serological epidemiological data on Toxocara infections in the Lithuanian SSR. Ak. Nav. Lit. Zool. Parasitol.: 103-106.
- *BAIORINENE, D.V.; BALKJAWICZIUS, B. (1.988).- The problem of toxocariasis in Lithuania. Wiad. Parasitol. 34 (3): 233-238.
- *BALMER, T.V.; EVANS, E.; HERBERT, I.V. (1.982).- Prevalence of Sarcocystis species and other parasites in hunting dogs in Gwynedd, North Wales. Vet. Rec. 110 (14): 331-332.
- *BARRIGA, O.O.; MYSER, W.C. (1.987).- Effects of irradiation on the biology of infective larvae of Toxocara canis in the mouse. J. Parasit. 73 (1): 89-94.
- *BARRIGA, O.O.; CARRILLO, M. (1.987).- Immunization and protection associated antigens in Toxocara canis infections of laboratory animals. 62nd. Annu. Meet. Amer. Soc. Parasitol. Lincoln, NE, 2-6 August (abstract 86).

- *BARSOU, I.S.; COLLEY, D.G.; KAMAL, K.A. (1.990).- Schistosoma mansoni: Detection of circulating antigens in murine schistosomiasis by antigen-capture sandwich ELISA using a monoclonal antibody. Exp. Parasitol. 71: 107-113.
- *BASS, J.L.; MEHTA, K.A.; GLICKMAN, L.T.; BLOCKER, R.; EPPE, B.M. (1.987).- Asymptomatic Toxocariosis in children. Clin. Ped. 26 (9): 441-446.
- *BAUFINE-DUCROCO, H.; COUZINEAU, P.; BEAUVAIS, B. (1.974).- Diagnostic par la reaction d'immunofluorescence du syndrome de "larva migrans viscerale". Bull. Soc. Pathol. Exot. 66 (6): 746-751.
- *BEAVER, P.C.; SNYDER, C.H.; CARRERA, G.M.; DENT, J.M.; LAFFERTY, J.W. (1.952).- Chronic eosinophilia due to Visceral Larva Migrans. Pediatrics 9: 7-9.
- *BEAVER, P.C. (1.966).- Zoonoses, with particular reference to the parasites of veterinary importance. Biology of Parasites, E.J.L. Soulsby (Editor), Academic Press, New York: 215-225.
- *BEAVER, P.C.; JUNG, R.C.; CUPP, E.W. (1.986).- Parasitología Clínica. 2a Ed. Salvat.
- *BEKHTI, A. (1.984).- Mebendazole in toxocariasis. Am. Inter. Med. 100 (3): 463.
- *BENTZEL, C.J.; PARSE, E.; HARE, D.K. (1.969).- Amer. J. Physiol. 217: 57-180.
- *BERRIDGE, M.J.; OSCHMAN, J.L. (1.972).- Trans. Epithel. Academic Press, New York.
- *BIRD, A.F. (1.971).- In Structure of nematodes. Ed. Academic Press. 300p. New York and London.
- *BISSERU, B. (1.969).- Studies on the liver, lung, brain and blood of experimental animals infected with Toxocara canis. J. Helminthol. 43 (3/4): 267-272.
- *BORCHERT (1.975).- Parasitología veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza.
- *BOREHAM, P.F.L.; CAPRON, A.G. (1.982).- Environmental contamination with canine zoonotic helminths in Brisbane. Aus. Vet. Prac. 12 (1/2): 14-18.
- *BOSSE, M. (1.980).- The action of various benzimidazole carbamates on the somatic larvae of Ancylostoma caninum (Ancylostomidae) and Toxocara canis (Anisakidae) in the bitch. Inaug.-Dissert. Tierarz. Hochs. Hann.: 84 p.p.
- *BOSSE, M.; MANHARDT, J.; STOE, M. (1.980).- Epizootiology and control of neonatal helminth infections in dogs. Z. Veterinarmed. 30: 247-256.
- *BOSSE, M.; STOE, M. (1.981).- Effect of various benzimidazole carbamates on somatic larvae of Ancylostoma caninum (Ancylostomidae) and Toxocara canis (Anisakidae). 2- Observations on pregnant bitches. Z. Veterinarmed. 28 (4): 265-279.
- *BOUCHET, F.; LEGER, N. (1.985).- Structure of Toxocara canis eggs (Nematoda-Ascarididae). Bull. Soc. Franc. Parasitol. 1: 133-138.
- *BOWMAN, D.D.; MIKA-GRIEVE, M.; GRIEVE, R.B. (1.987).- Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody response in mice infected with Toxocara canis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 36 (1): 75-82.
- *BOYCE, W.M.; BRANSTETTER, B.A.; KAZACOS, K.R. (1.988).- Comparative analysis of larval excretory-secretory antigens of Baylisascaris procyonis, Toxocara canis and Ascaris suum by western blotting and enzyme immunoassay. Int. J. Parasitol. 18 (1): 109-113.

- *BOYCE, W.M.; ASAI, D.J.; WILDER, J.K.; KAZACOS, K.R. (1.989).- Physicochemical characterization and monoclonal and polyclonal antibody recognition of Baylisascaris procyonis larval excretory-secretory antigens. J. Parasitol. 75 (4): 540-548.
- *BOZDECH, V. (1.981).- Human infections with Toxocara larvae. I- Findings of eggs in parks in Prague. Ang. Parasitol. 22 (2): 71-77.
- *BRADFORD, M. (1.976).- A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann. Biochem. 72: 248.
- *BRINDLEY, P.J.; PROCIV, P.; CREEVEY, C.A., EAST, I.J. (1.985).- Regulation of toxocariosis in mice selectively reared for high and low immune responses to Nematospiroides dubius. J. Helminthol. 59 (2): 157-166.
- *BRUNELLO, F.; GENCHI, C.; FALAGIANI, P. (1.983).- Detection of larvae-specific IgE in human toxocariosis. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 77 (2): 279-280.
- *BRUNELLO, F.; FALAGIANI, P.; GENCHI, C. (1.986).- Enzyme immunoassay (ELISA) for detection of specific IgG antibodies to Toxocara canis ES antigens. Boll. Ist. sieroter. Milan, 65: 54-60.
- *BURKE, T.M.; ROBERSON, E.L. (1.983).- Fenbendazole treatment of pregnant bitches reduce prenatal and lactogenic infections of Toxocara canis and Ancylostoma caninum in pups. J. Amer. Vet. Med. Ass. 183 (9): 987-900.
- *BURKE, T.M.; ROBERSON, E.L. (1.985).- Prenatal and lactational transmission of Toxocara canis and Ancylostoma caninum: experimental infection of the bitch before pregnancy. Int. J. Parasitol. 15 (1): 71-75.
- *BURRIGTH, R.G.; DONOVICK, P.J.; DOLINSKY, Z.; HURD, Y. (1.982).- Behavioral changes in mice infected with Toxocara canis. J. Toxicol. Env. Hlth. 10: 621-626.
- *BYERS, B.; KIMURA, S.J. (1.974).- Uveitis after death of a larva in the vitreous cavity. Am. J. Ophthalmol. 77: 63-66.

—C—

- *CARLIER, Y.; YANG, J.; BOUT, D.; CAPRON, A. (1.982).- The use of an excretory-secretory antigen for an E.L.I.S.A. specific serodiagnosis of visceral larva migrans. Biomedicine 36: 39-42.
- *CARRILLO, M.; BARRIGA, O.O. (1.987).- Anthelmintic effect of levamisole hydrochloride or ivermectin on tissue toxocariasis of mice. Am. J. Vet. Res. 48 (2): 281-283.
- *CASAROSA, L.; LUGETTI, G. (1.982).- Ivermectin in infection of mice by Toxocara canis L₂ larvae. Preliminary note. Att. Soc. Ital. Vet. 36: 667.
- *CASAROSA, L.; ORLANDI, M.; SBRANA, L.; CARUGINI, L. (1.982).- Precocita della comparsa degli anticorpi serici svelati mediante opsonic adherence reaction in conigli sperimentalmente infestati con uova embrionate di T. canis. Ann. Fac. Med. Vet. 35: 25-29.
- *CASAROSA, L.; GHELARDONI, E.; LUGETTI, G.; MAGI, G.; BIGINI, M.; SBRANA, L. (1.983).- Ricerche sull'efficacia terapeutica dell'Ivermectina nella microascaridiosi sperimentale del topo da larve L₂ di Toxocara canis. Ann. Fac. Med. Vet. 36: 181-186.

- *CASAROSA, L.; MARCONCINI, A.; LUGETTI, G.; MAGI, M.; PAPINI, R.; TOSO, D.; SBRANA, L. (1.984).- L'Ivermectina nella microascaridiosi del topo da larve L₂ di Toxocara canis: studio dell'efficacia del farmaco (valuato sulla capacità d'inibire nel topo la colonizzazione muscolare et encefalica delle larve elmintiche) in rapporto al tempo de somministrazione del farmaco rispetto al momento del conferimento dell'infestazione. Ann. Fac. Med. Vet. 37: 141-145.
- *CASAROSA, L.; MAGI, M.; CAMPO, M.; PAPINI, R.; SBRANA, L.; BIGINI, M. (1.985).- Indagini sulla capacità migratoria pliriviscerale delle larve L₂ di Toxocara canis ottenute da topi "donatori" infestati con uova embrionate del parassita e poi sottoposti a terapia con ivermectina inoculate in topi "ricevitori" indenni. Ann. Fac. Med. Vet. 38: 319-324.
- *CASAROSA, L.; PAPINI, R.; MAGI, M.; MANCIANTI, F.; MALLOGGI, M.; MASSINA, M.; SASSETTI, M.; LUGETTI, G.; CERRETA, S. (1.987).- Indagini sull'attività migratoria pluriviscerale nel topo delle larve L₂ di Toxocara canis preventivamente cimentate "in vitro" con ivermectina. Ann. Fac. Med. Vet. XL: 55-56.
- *CHARTIER, C; CHARTIER, F. (1.990).- Helminths of domestic dogs in northeastern Zaire. Rev. Med. Vet. 141 (10): 771-775.
- *CHIEFFI, P.P.; MULLER, E.E. (1.976).- Prevalencia de parasitismo por Toxocara canis em caes e presenca de ovos de Toxocara gr no solo de localidades públicas da zona urbana do municipio de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. Rev. Saúde. Publ. S. Paulo. 10: 367-372.
- *CHIEFFI, P.P.; MULLER, E.E. (1.978).- Estudo da variação mensal na contaminação do solo por ovos de Toxocara sp. (Nematoda, Ascaroidea), na zona urbana do municipio de Londrina, Estado de Paraná, Brasil. Rev. Iber. Adolfo Lutz 38 (1): 13-16.
- *CHIEJINA, S.N.; EKWE, T.O. (1.986).- Canine toxocariosis and the associated environmental contamination of urban areas in eastern Nigeria. Vet. Parasitol. 22: 157-161.
- *CHILDS, J.E. (1.985).- The prevalence of Toxocara species in backyards and gardens of Baltimore, Maryland. Am. J. Pub. Health. 75 (9): 1.092-1.905.
- *CHOO, L.N. (1.987).- Gastrointestinal helminths of dogs and cats in Singapore. Singapore Vet. J. 10-11: 12-24.
- *CHRISTENSEN, O.; NANSEN, P. (1.979).- The preparation and use of radiolabelled parasites and biological substances for studies on host-parasite relationship, with special reference to trematodes. A review. Int. Atom. Energ. Agen. Advisory Group Meeting, Animal Parasitology Cambridge, 10th-11th September.
- *CHRISTENSSON, D. (1.988).- High latitude Toxocara. Parasitology Today 4 (11): 332.
- *CHRITCHLEY, E.M.R.; VAKIL, S.D.; HUTCHINSON, D.N.; TAYLOR, P. (1.982).- Toxoplasma, Toxocara and epilepsy. Epilepsia 23: 315-321.
- *CHURCHER, S.W. (1.976).- A review of some of the risks to human health from dogs. Environment Health. 1: 220-226.
- *CONCEPCION, J.E.; BARRIGA, O.O. (1.985).- Transfer of infection-induced protection to Toxocara canis in

a mouse model. Vet. Immunol. Immunopathol. 9: 371-382.

- *CONDE-GARCIA, L.; MURO ALVAREZ, A.; SIMON MARTIN, F. (1.989).- Epidemiological studies on toxocariasis and visceral larva migrans in a zone of western Spain. Ann. Trop. Med. Parasitol. 83 (6): 615-620.
- *CRANDAL, C.A. (1.976).- Ascaris suum: homocytotropic antibody responses in mice. Exp. Parasitol. 39: 69-73.
- *CRANE, T.B.; CHRISTENSEN, G.R. (1.981).- Presumed subretinal nematode infestation with visual recovery, Ann. Ophthalmol. 13: 345-348.
- *CROWCROFT, N.S.; GILLESPIE, S.H. (1.991).- Hatching of second-stage larvae of Toxocara canis: a rapid method for processing large numbers of worms. J. Helminthol. 65: 311-312.
- *CRUISE, K.M.; MITCHELL, G.F.; GARCIA, E.G.; ANDERS, R.F. (1.981).- Hybridoma antibody immunoassays for the detection of parasitic infection: further studies on a monoclonal antibody with immunodiagnostic potential for Schistosoma japonicum. Acta Trop. 38, 437.
- *CUELLAR, C.; DEL AGUILA, C.; FENOY, S.; GUILLEN, J.L. (1.990, a).- Comparative study of E.L.I.S.A. diagnostic index and larval microprecipitation test in human toxocariosis. VII Congrès Int. Parasitol. Paris. Agosto, 1.990, 8 (1): 952.
- *CUELLAR, C.; FENOY, S.; AGUILA, C.; GUILLEN, J.L. (1.990, b).- Evaluation of chemotherapy in experimental toxocarosis by determination of specific immune complexes. J. Helminthol. 64: 279-289.
- *CUELLAR DEL HOYO, C.; FENOY RODRIGUEZ, S.; GUILLEN-LLERA, J.L. (1.990, c).- Dinámica de la respuesta inmune humoral en dos cepas murinas. I Inoculación con huevos embrionados de Toxocara canis, Toxascaris leonina y Ascaris suum. Rev. Ibér. Parasitol. 50 (1-2): 137-150.
- *CUELLAR DEL HOYO, C.; FENOY RODRIGUEZ, S.; GUILLEN-LLERA, J.L. (1.990, d).- Dinámica de la respuesta inmune humoral en dos cepas murinas. II- Inoculación con antígeno total de Toxocara canis, Toxascaris leonina y Ascaris suum. Rev. Ibér. Parasitol. 50 (3-4): 329-338.
- *CYPESS, R.H.; KAROL, M.H.; ZIDIAN, J.L.; GLICKMAN, L.T.; GITLIN, D. (1.977).- Larva-specific antibodies in patients with visceral larva migrans. J. Infect. Dis. 135 (4): 633-640.
- *CYPESS, R.H.; GLICKMAN, L.T. (1.978).- Serological tests for Toxocara. Lancet 9: 579.

- D -

- *DADA, B.J.O.; LINDQUIST, W.D. (1.979, a).- Studies on flotation techniques for the recovery of helminth eggs from soil and the prevalence of eggs of Toxocara spp. in some Kansas public places. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 174 (11): 1.208-1.210
- *DADA, B.J.O.; LINDQUIST, W.D. (1.979, b).- Prevalence of Toxocara spp. eggs in some public grounds and highway rest areas in Kansas. J. Helminthol. 53: 145-146.
- *DADA, B.J.O.; ADEGBOYE, D.S.; MOHAMMED, A.N. (1.980).- The epidemiology of Echinococcus infection in Kano State, Nigeria. An. Trop. Med. Parasitol. 74 (5): 515-517.
- *DAFALLA, A.A.; ALI OMER, M.I. (1.977).- Toxocariasis in a Sudanese boy. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 71 (6): 544-545.

- *DAFALLA, A.A. (1.978).- Homologous passive cutaneous anaphylactic reactions to Toxocara canis in mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72 (3): 309-310.
- *DAMADIAN, R. (1.971).- Tumor detection by nuclear magnetic resonance. Science 171: 1151-1153.
- *DAVIDYANTS, V.A.; CHOBANYAN, A.G. (1.981).- Some aspects of the epizootiology and epidemiology of toxocariosis. Med. Parazitol. Trop. Med.: 83-84.
- *DAVIDYANTS, V.A. (1.982).- Investigations of environmental objects for Toxocara ova. Med. Parazitol. Parazitar. Bol. 3: 67-70.
- *DAVIDYANTS, V.A.; CHOBANYAN, A.G. (1.984).- Prevalence of toxocariosis in dogs in the Armenian SSR. Byull. Inst. Gel'mintol. 38: 56-57.
- *DELGADO, O.; BOTTO, C.; MATTEI, R.; ESCALANTE, A. (1.989).- Effect of albendazole in experimental toxocariasis of mice. Ann. Trop. Med. Parasitol. 83(6): 621-624.
- *DESOWITZ, R.S.; RUDOLPH, R.; BARNWELL, J.W. (1.981).- Antibodies to canine helminth parasites in asthmatic and nonasthmatic children. Int. Archs. Allergy appl. Immun. 65: 361-366.
- *DIMAYUGA, E.; STOKER, M.; KAYES, S.G. (1.991).- Eosinophil peroxidase levels in hearts and lungs of mice infected with Toxocara canis. J. Parasitol. 77 (3): 461-466.
- *DODGE, J.S. (1.980).- Toxocara canis: The risks of infection. New Zealand Med. J. 91 (651): 24-26.
- *DOBINSON, A.R.; JAMES, E.R.; CHRISTENSEN, N.O. (1.980).- Int. J. Nucl. Med. Biol. 7: 195-196. *DUBRY, J.P. (1.979).- Effect of fenbendazole on Toxocara canis larvae in tissue of infected dogs. Am. J. Vet. Res. 40: 698-699.
- *DUCOFF, H.F. (1.976).- Radiation-induced increase in lifespan of insect. Biological and environmental effects of low level irradiation. IAEA, Vienna: 103-109.
- *DUNSMORE, J.D.; THOMPSON, R.C.A.; BATES, I.A. (1.983).- The accumulation of Toxocara canis larvae in the brain of mice. Int. J. Parasitol. 13 (5): 517-521.
- *DUTOIT, E.; POIRRIEZ, J.; LECLERCQ, P.; VERNES, A.; PONTAINE, G. (1.983).- Intérêt du fenbendazole dans le traitement de la toxocarose. La Presse Médicale 12 (38): 2.396.
- *DUWELL, D. (1.983, a).- Toxocariosis in humans and veterinary medicine and how to prevent it. Helminthologia 20: 277-286.
- *DUWEL, D.; DEGENHARDT, H. (1.983, b).- Susceptibility to Toxocara canis of puppies born with little or no nematode infection. Deut. Tierärztl. Wochens. 93 (9): 441-444.

— E —

- *EAST, I.J.; WASHINGTON, E.A.; BRINDLEY, P.J.; MONROY, G.P.; SCOTT-YOUNG, N. (1.988).- Nematospiroides dubius passive transfer of protective immunity to mice with monoclonal antibodies. Exp. Parasitol. 66 (1): 7-12.
- *EDWARDS, M.G.; PORDELL, G.R. (1.985).- Ocular toxocariasis studied by CT Scanning. Radiology. 157 (3): 685-686.
- *EDWARDS, G.T.; HACKETT, F.; HERBERT, I.V. (1.979).- Taenia hydatigena and Taenia multiceps infections in Snowdonia, U.K. II. The role of hunting dogs and foxes as definitive hosts and of sheep

- as intermediate hosts. British Vet. J. 135 (5): 433-439.
- *EMBIL, J.A.; TANNER, C.E.; PEREIRA, L.H.; STAUDT, M.; MARRISON, E.G.; GUALAZZI, D.A. (1988).- Seroepidemiological survey of Toxocara canis infection in urban and rural children. Pub. Health. 102: 129-133.
- *ENAYAT, M.S.; PEZESHKI, M. (1977).- The comparison of counterimmunoelectrophoresis with indirect haemagglutination test for detection of antibodies in experimentally infected guinea pigs with Toxocara canis. J. Parasitol. 51 (2): 143-148.
- *ENGVAL, E.; PERLMANN, P. (1972).- Enzyme-linked immunosorbent assay, E.L.I.S.A. III-Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunol. 109 (1): 129-135.
- *ERTL, H.C.J.; HOMANS, E.S.; FINBERG, R.W. (1984).- Sendi virus-specific T cell clones V. Induction of cytolytic T cells by an anti-idiotypic antibody directed against a helper T cell clone. J. Exp. Med. 159: 1.778-1.783.
- *ESLANI, A.; MOHEBALI, M. (1988).- Parasitism of shepherd dogs and their importance to public health in Iran. Bull. Soc. Pathol. Exot. Fil. 81 (1): 94-96.
- F —
- *FAIRBAIRN, D. (1961).- The "in vitro" hatching of Ascaris lumbricoides eggs. Can. J. Zool. 39: 153-162.
- *FANNING, M.; HILL, A.; LANGER, H.M.; KEYSTONE, J.S. (1981).- Visceral Larva Migrans (Toxocariasis) in Toronto. C.M.A. Journal, 124: 21-26.
- *FASHUYI, S.A. (1981).- Diagnostics of gastro-intestinal helminths of dogs in Lagos area using the Kato-Katz technique. Bull. Ann. Health Prod. Afr. 29 (4): 333-335.
- *FATTAH, D.I.; MAIZELS, R.M.; McLAREN, D.J.; SPRY, C.J.F. (1986).- Toxocara canis: Interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. Exp. Parasitol. 61: 421-431.
- *FELBERG, N.T.; SHIELDS, J.A.; FEDERMAN, J.L. (1981).- Antibody to Toxocara canis in the aqueous humor. Arch. Ophthalmol. 99: 1563-1564.
- *FENOY, S.; CUELLAR, C.; AGUILA, C.; GUILLEN, J.L. (1992).- Persistence of immunoresponse in human toxocariosis as measured by E.L.I.S.A.. Int. J. Parasitol., (Aceptado, en prensa).
- *FERAUD, J.P.; RICHARD, S.; POVEYMIDOU, B. (1988).- Assessment of faecal examinations carried out on dogs recruited by the French army. Rev. Med. Vet. 139 (11): 1.023-1.025.
- *FERNANDO, A.N. (1960).- Immunological studies with I¹³¹ labeled antigen in experimental uveitis. Arch. Ophthalmol. 3: 515-539.
- *FREEMAN, R.F.; TREJDOSIEWICZ, A.J.; CROSS, G. (1980).- Protective monoclonal antibodies recognizing stage-specific merozoite antigens of rodent malaria parasites. Nature 284: 366.

- *GALANT, S.P.; GLICKMAN, L.T.; LOSCIAPO, F.; KLEIN, G. (1.980).- Serological diagnosis of Toxocara canis infection. Southern. Med. J. 73 (4): 435-437.
- *GALLEGO BERENGER, J.; PUMAROLA BUSQUETS, A. (1.952).-Parasitismo por helmintos en los perros vagabundos de Barcelona. Rev. Iber. Parasitol. 12: 205-213.
- *GENCHI, C. (1.976).- Incidence of eggs of some species of intestinal helminths of the dog in public parks in Milan. Arch. Vet. Ital. 27 (3/4): 98-99.
- *GENCHI, C.; ALMAVIVA, M.; CROCCHIOLO, P.; BRUNELLO, F.; FALAGIANI, G.; SIMONELLI, E.; SIOLI, C.; VIEGENANI, G.M. (1.983, a).- Anticorpi IgE contra Toxocara canis in popolazione "a rischio". G. Mal. Infett. Parassit. 12 (35): 1478-1481.
- *GENCHI, C.; BRUNELLO, F.; FALAGIANI, P.; SIOLI, C.; ALMAVIVA, M. (1.983, b).- Larva specific IgE against Toxocara hatched larvae antigens in sera of Toxocaral syndromes patients and healthy blood donors. Asc. Microbiol. Clin. Ital. : 27-29.
- *GENCHI, C.; TINELLI, M.; BRUNELLO, F.; FALAGIANI, P. (1.986).- Serodiagnosis of ocular toxocariasis: a comparison of specific IgE and IgG. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 80: 993-994.
- *GENCHI, C.; FALAGIANI, P.; RIVA, G.; SIOLI, C. (1.987).- Ocular toxocariasis: role of IgE in the pathogenesis of the syndrome and diagnostic implications. Helminth zoonoses. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Netherlands: 175-182.
- *GENCHI, C.; MANFREDI, M.T.; CALEGARI, M.R.; DI SACCO, B. (1.989).- Contamination of the environment by Toxocara canis eggs: role of a dog show, and effect of calcium cyanamide treatment on the ground. Arch. Vet. Ital. 40 (2): 112-117.
- *GENCHI, C.; MANFREDI, M.T.; SACCO, B. DI; TRALDI, G.; FRANZELLI, D. (1.990).- Efficacy of nitroscanate in the treatment of helminth infections in dogs: comparative evaluation with mebendazole formulations. Veterinaria (Cremona) 4 (1): 93-97.
- *GERIN, G.; PECHEUR, M.; GIANFREDA, H. (1.980).- Frequency of intestinal parasites among domestics carnivores. An. Med. Vet. 124 (2): 133-136.
- *GHADIRIAN, E.; VIENS, P.; STROYKOWSKI, H.; DUBREVIL, F. (1.976).- Epidemiología de la toxocariosis en el área de Montreal. Prevalencia de Toxocara y otros helmintos en perros y tierra. Can. J. Public. Health, 67 (6): 495-498.
- *GILLES, R.; PEQUEAUX, A. (1.986).- Bull. Zool. 53: 173-182.
- *GIULIANI, G.; VENZA, E.; STRACCA, V.; MENALDO, G.; CADROBI, P. (1.984).- Granulomatous hepatitis caused by Toxocara. A clinical case. G. Mal. Infectt. Parassit. 36 (1): 33-35.
- *GLASS, I.; KUTTIN, E.S. (1.988).- Antihelminthic and anticoccidial activity of a natural extract of plant origin. Isr. J. Vet. Med. 44 (2): 128-133.
- *GLICKMAN, L.T.; CYPESS, R.H. (1.977).- Toxocara infection in animal hospital employess. Am. J. Parasitol. Health. 67 (12): 1.193-1.195.
- *GLICKMAN, L.T.; SCHANTZ, P.; DOMBROSKE, R.; CYPESS, R.H. (1.978).- Evaluation of serodiagnostic test for visceral larva migrans. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27 (3): 492-498.

- *GLICKMAN, L.T.; SCHANTZ, P.M.; CYPESS, R.H. (1979).- Epidemiological characteristics and clinical findings in patients with serologically proven toxocariasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 73 (3): 254-258.
- *GLICKMAN, L.T.; CAUDRY, I.V.; CONSTANTINO, J.; CLACK, F.B.; CYPESS, R.H.; WINSLOW, L. (1981, a).- Pica patterns, toxocariasis and evaluated blood lead in children. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30 (1): 77-80.
- *GLICKMAN, L.T.; DUBBY, J.P.; WINSLOW, L.J. (1981, b).- Serological response of ascarid-free dogs to Toxocara canis infection. Parasitology 82: 383-387.
- *GLICKMAN, L.T.; SOMMERS, B.A. (1983).- Experimental Toxocara canis infection in cynomolgus macaques (Macaca fascicularis). Am. J. Vet. Res. 44 (12): 2.347-2.354.
- *GLICKMAN, L.T.; GRIEVER, B.; GREGORY, K.T.; FRIEDMAN, H.S.; STOCKMAN, J.A. (1984).- Toxocara antigen and mitogen-induced lymphocyte blastogenesis for diagnosis of visceral larva migrans: clinical and experimental findings in macaques and human beings. Am. J. Vet. Res. 45 (6): 1.235-1.237.
- *GLICKMAN, L.T.; SCHANTZ, P.M. (1985, a).- Do Toxocara canis larval antigens used in enzyme-linked immunosorbent assay for visceral larva migrans cross-react with AB isohemagglutinins and give false positive resultats. Z. Parasitenkd.: 395-400.
- *GLICKMAN, L.T.; GRIEVE, R.B.; LAURIA, S.; JONES, D.L. (1985, b).- Serodiagnosis of ocular Toxocariosis: a comparison of two antigens. J. Clin. Pathol. 38: 103-107.
- *GLICKMAN, L.T.; MAGNAVAL, J.F.; DOMANSKI, L.M.; SHOFR, F.S.; LAURIA, S.S.; GOTTSTEIN, B.; BROCIER, B. (1987). Visceral larva migrans in French adults: A new disease syndrome?. Am. J. Epidemiol. 125 (6): 1019-1033.
- *GOFFAN-KUETTNER, M.; WANG, A.; NISONOFF, A. (1972).- Quantitative investigation of idiotypic antibodies. VI Idiotypic specificity as a potential genetic marker for the variable regions of mouse immunoglobulin polypeptide chains. J. Exp. Med. 135: 579-595.
- *GONZALEZ CASTRO, J.; TORMO, J.; CHORDI, A. (1962).- Aportación al estudio de los helmintiasis intestinales en los perros. I. Especies parásitas e índices de parasitación. Rev. Ibér. Parasitol. 22: 271-284
- *GORASH, U.R.; ALEKSEVA, M.I. (1985).- The results of a 3 year study of the contamination with Toxocara eggs of the soil at Kishinev. Med. Parazitol. Parazitarn Bol. 1: 77-80.
- *GORP, K. VAN; MANGELSCHOTS, M.; BRANDT, J. (1987).- Toxocara vitulorum: a possible agent of larva migrans in humans? Helminth zoonoses. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands.: 159-166.
- *GRABIEC, S.; GUTTOWA, A.; CABAJ, W.; (1988, a).- The use of nuclear magnetic resonance (NMR) to study tissues of mice infected with Trichinella spiralis and Trichinella pseudospiralis. Acta Parasitol. Polonica 33 (3): 209-213.
- *GRABIEC, S.; GUTTOWA, A.; WRANICZ, M. (1988, b).- T_1 and T_2 NMR relaxation times in cattle liver tissue during Fasciola hepatica invasion. Bull. Polish. Academy Sciences. Biological

- *GRANADOS TEJERO, D; GOMEZ GARCIA, V; RODRIGUEZ OSORIO, M (1.986).- Epidemiologia de la toxocariosis. I. Estudio del parasitismo por ascaridos en los perros de Granada. Rev. San. Hig. Pub. 609.: 105-112.
- *GREENWOOD, I.C.; HUNTER, W.M.; GLOVER, J.S. (1.963).- The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89: 114-123.
- *GREGOIRE, I.J.; SHI, M.; REKOS H.D.M.; LOVERDE, P.T. (1.987).- Protective monoclonal antibodies from mice vaccinated or chronically infected with Schistosoma mansoni that recognize the same antigens. J. Immunol. 139 (11): 3.792-3.801.
- *GRELCK, H; HÖRCHNER, F; UNTERHOLZNER, J. (1.981).- Zur serologischen differenzierung von Ascaris suum und Toxocara canis infektionen beim Schwein. Z. Parasitenkd. 65: 277-282.
- *GROSS, E.M.; ZEITAN, R.; TOROK, V. (1.984).- Toxocara canis infection in dogs in Beersheba, Israel. J. Helminthol. 58 (2): 139-141.
- *GRZYCH, J.M.; CAPRON, M.; BAZIN, H.; CAPRON, A. (1.982).- "In vitro" and "in vivo" effector function of rat IgG2a monoclonal anti-S. mansoni antibodies. J. Immunol. 129 (6): 2.739-2.743.
- *GRZYCH, J.M.; CAPRON, M.; DISSOUS, C.; CAPRON, A. (1.984). Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. J. Immunol. 133 (2): 998-1.004.
- *GRZYCH, J.M.; CAPRON, M.; LAMBERT, P.H.; DISSOUS, C.; TORRES, S.; CAPRON, A. (1.985).- An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. Nature. 316: 74-76.
- *GUALAZZI, D.A.; EMBIL, J.A.; PEREIRA, L.H. (1.986).- Prevalence of helminth ova in recreational areas of peninsular Halifax, Nova Scotia. Can. J. Pub. Health. 77: 147-151.
- *GUILLEN, J.L.; SANCHEZ-COVISA, A. (1.977).- Incidencia de huevos de Toxocara canis en las heces de perro en las calles de Madrid. I. Reunión Anual A.P.E., Madrid, 1.977.
- *GUILLEN, J.L.; CUELLAR, C.; AGUILA, C. (1.986, a).- Larva Migratoria Visceral: estudio mediante E.L.I.S.A. de tres grupos familiares. Pediatrica 6 (1): 28-32.
- *GUILLEN, J.L.; CUELLAR, C.; AGUILA, C. (1.986, b).- Fotodependencia del desarrollo embrionario de Toxocara canis (Werner, 1.782) Stiles 1.905. Rev. Iber. Parasitol. 46 (1): 67-74.
- *GUNASEELAM, L.; RAMADASS, P.; RAGHAVAN, N. (1.985).- Epidemiological studies on Toxocara canis infections in children in Madras city. Cheiron 14 (6): 326-328.
- *GUNASEELAN, L.; RAMADASS, P.; RAGHAVAN, R. (1.986).- Serological diagnosis of Toxocara canis infection in children. Indian Vet. J. 63: 828-832.
- *GUPTA, A.K. (1.984).- A simple method of artificial hatching of Toxocara canis in vitro and preparation of excretory-secretory antigen. Current. Sci. 53 (10): 529-530.
- *GUPTA, C.K.; RAY, S.; BANERJEE, K.N. (1.973).- Incidence of gastro-intestinal parasites in dogs studied at Calcuta. Ind. J. An. Hel. 12 (1): 109-110.
- *GURALAP, N.; BINCER, S.; KEMER, R.; CANTORAY, R.; TASAN, E. (1.977).- Distribution and public health significance of gastro-intestinal helminths in stray dogs in Elazig. Ank. Uni. Vet. Fak. Derg. 24 (2): 241-249.

- *HAGLER, W.S.; POLLARD, Z.F.; JARRET, N.H. (1981).- Results of surgery for ocular Toxocara canis. Ophthalmology 88 (10): 1.081-1.086.
- *HAMMOUDA, N.A.; YOUSSEF, M.; AWADALLA, H.N.; EL-SAWY, M.; AMIN, S.M.; EL-NASERY, S.F. (1982).- Pathological and Immunological studies on experimental visceral larva migrans. J. Egypt. Soc. Parasitol. 12 (1): 25-32.
- *HAQUE, A.; AGCARWA, A.; CUNA, W.; OULAQUE, G.; CESBRON, J.Y.; CAPRON, A. (1983).- The use of monoclonal antibodies in studies of filarial parasite antigens. Develop. Biol. Standard. 59: 63-68.
- *HARN, D.A.; MITSUYAMA, M.; DAVID, J. (1984).- Schistosoma mansoni: anti-egg monoclonal antibodies protect against cercarial challenge "in vivo". J. Exp. Med. 159 (5): 1.371-1.387.
- *HARRISON, L.J.; PARKHOUSE, R.M.E. (1985).- Passive protection against Taenia saginata infection in cattle by a mouse monoclonal antibody reactive with the surface of the invasive oncosphere. Parasit. Immunol. 8: 319-332.
- *HARTREE, E.F. (1972).- Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem. 48: 422-427.
- *HASS, D.K.; TODD, A.C. (1962).- Extension of a technique for hatching ascaris eggs "in vitro". Am. J. Vet. Res. 1: 169-170.
- *HAY, J.; AITKEN, P.P. (1984).- Experimental toxocariasis in mice and its effect on their behaviour. An. Trop. Med. Parasitol. 2 (78): 145-155.
- *HAY, F.C.; THANAVALA, Y; ROITT, I.M. (1984).- Idiotypic vaccines. Immune Intervention. Academic Press, London: 117-139.
- *HERD, R. (1979).- Preventing visceral larva migrans. J. Am. Vet. Med. Ass. 174 (8): 780-782.
- *HERRMANN, N.; GLICKMAN, L.T.; SCHANTZ, P.M.; WESTON, M.G.; DOMANSKI, L.M. (1985).- Seroprevalence of zoonotic toxocariasis in the United States 1971-1973. Am. J. Epidemiol. 122 (5): 890 - 896
- *HERSKOVIC, P.; ASTORGAS, B. (1985).- Toxocariasis humana en Chile. Rev. Med. Chile 113: 18-21.
- *HERLICH, H. (1956).- A digestion method for postmortem recovery of nematodes from ruminants. Proc. Helminthol. Soc. 23 (2): 102-103.
- *HIGA, A.; MARUYAMA, H.; ABE, T.; OWHASHI, M.; NAWA, Y. (1990).- Effects of Toxocara canis infection on hemopoietic stem cells and hemopoietic factors in mice. Int. Arch. Appl. Immunol. 91: 239-243.
- *HINDSBO, O; MORTENSEN, J.S. (1983).- Studies on Toxocara in dogs, ecology of eggs and experimental infections of T.canis and T.cati in mice. Inf. Abo. Akad. Finland. 17: 16-17.
- *HINZ, E. (1980).- Der Darmhelminthenbefall bei Straßenhunden in Bangkok, Thailand, und seine Bedeutung für die Gesundheit des Menschen. Zbl. Bakt. Hyg. 171: 79-85.
- *HO, T.T.; KOBULEY, T. (1974).- Studies on the migration of Toxocara canis larvae in the mouse. Parasitol. Hung. 7: 55-67.

- *HOGARTH-SCOTT, R.S.; FERRY, B.J. (1.976).- The specificity of nematode allergens in the diagnosis of human larva migrans. Aus. J. Exper. Biol. Med. Sci. 54 (4): 317-327.
- *HOLT, P.E. (1.976).- Toxocara canis: An estimation of the incidence of infection in puppies in an industrial town. Vet. Rec. 98 (19): 383.
- *HOLT, P.E.; CLARKSON, M.J.; KERSLAKE, M. (1.981).- Anthelmintic test on Toxocara canis infection in mice. Vet. Record. 108 (4): 308-309.
- *HORCHNER, F.; UNTERHOLZNER, J.; FRESE, K. (1.981).- Occurrence of Toxocara canis and other endoparasites in dogs in Berlin (West). Berl. Munch. Tierarztl. Wochens. 94 (11/12): 220-223.
- *HUNTLEY, C.C.; MORELAND, A. (1.963).- Gel diffusion studies with Toxocara and Ascaris extracts. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 12: 204-208.
- *HUWER, M.; SANFT, S.; AHMED, J.S. (1.989).- Enhancement of neutrophil adherence to Toxocara canis larvae by the C₃ component of complement and IgG antibodies. Zbl. Bakt. Hyg. A. 270: 418-423.

— I —

- *INOUE H.; TSUJI, M. (1.988).- Studies on visceral larva migrans: detection of anti-Toxocara canis IgG antibodies by ELISA in human and rat sera. Jap. J. Parasitol. 38 (2): 68-76.
- *IZZAT, N.N.; OLSON, L.J. (1.970).- Resistance of mice to Toxocara canis effect of prechallenge infections and infections of worm extracts. Can. J. Zool. 48: 1.063-1.066.
- *ILLESCAS, P.; GRANADOS, D.; AGUADO, F.; RODRIGUEZ, M. (1.985).- Estudio preliminar de las helmintiasis intestinales del perro (Canis domesticus) en la provincia de Granada. III cong. Nac. Parasitol. Barcelona, 1.985: 141.
- *IVEY, M.H. (1.965).- Immediate hypersensitivity and serological responses in guinea pigs infected with Toxocara canis or Trichinella spiralis. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 14: 1.044-1.051.

— J —

- *JACOBS, D.E.; WOODRUF, A.W.; SHAH, A.I.; PROLE, J.H.B. (1.977).- Toxocara infections and Kennel workers. Brit. Med. J. : 6052.
- *JENKINS, D.J.; RICKARD, M.D. (1.984).- Haematological and serological data from dogs raised worm-free and monoespecifically infected with helminths. Aus. Vet. J. 61 (10): 309-311.
- *JERNE, N.K. (1.974).- Ann. Immunol. (Paris) 125c: 373.
- *JERNE, N.K.; ROLAND, J.; CAZENAVE, P.A. (1.982).- EMBO J., 1: 243.
- *JHONSTONE, C.; LEVENTAL, R.; SOULSEY, E.J.L. (1.978).- The spin method for recovering tissue larvae and its use in evaluating C57BL/6 mice as a model for the study of resistance to infection with Ascaris suum. J. Parasitol. 64 (6): 1.015-1.020.
- *JIMENEZ MILLAN, F. (1.959).- Contribución al estudio de los helmintos parásitos de los animales domésticos. Rev. Iber. Parasitol. 19: 25-68.

*JOVANOVIĆ, M. (1964).- The production of an irradiated vaccine against Dyctiocaulus filaria. In Production and utilization of radiation vaccines against helminth diseases. International Atom. Energ. Agen. Technical report series. 30, Vienna: 25-31.

— K —

*KAGI, N.; KIHATA, M.; HORIUCHI, T.; SUZUKI, M. (1976).- Problem of parasitic infections of beagle dogs imported into Japan. Bul. Inst. Pub. Health. Jap. 25 (3): 140-144.

*KAREL, I.; PELESKA, M.; UHLIKOVA, M.; HUBNER, J. (1977).- Larva migrans lentis. Ophthalmologica, Basel, 174: 14-19.

*KASIECKA, J. (1982).- Contamination of open greens and of playgrounds in Vienna with the resting stages of dog and cat endoparasites pathogenic to man. Inaug. Diss. Vet. Uni. Viena: 216.

*KATO, N. (1973).- Studies on experimental toxocariasis. 3.- Resistance against challenge infection in infected or immunized mice and treatment with diethylcarbamazine of infected mice. Acta Scholae Medicinalis Universitatis in Gifu. 21 (2) 159-168.

*KAYES, S.G.; OAKS, J.A. (1976).- Effect of inoculum size and length of infection of distribution of Toxocara canis larvae in the mouse. Am. J. Trop. Med. Hyg. 25 (4): 573-580.

*KAYES, S.G. (1978).- An investigation of the role of the thymes derived lymphocyte in the pathogenesis of murine Toxocariasis. Diss. Abst. Int. 38 (7): 3125-3126.

*KAYES, S.G.; OAKS, J.A. (1978).- Development of the granulomatous response in murine Toxocarasis: initial events. Am. J. Parasitol. 93 (2): 277-294.

*KAYES, S.G.; OAKS, J.A. (1980).- Toxocara canis: T-lymphocyte function in murine visceral larva migrans and eosinophilia onset. Exp. Parasitol. 49: 47-55.

*KAYES, S.G. (1984).- Spleen cell responses in experimental murine Toxocariasis. J. Parasitol. 70 (4): 522-529.

*KAYES, S.G.; OMHOLT, P.E.; GRIEVE, R.B. (1985).- Immune responses of CBA/J mice to graded infections with Toxocara canis. Infect. Immun.: 697-703.

*KAYES, S.G.; JONES, R.E.; OMHOLT P.E. (1988).- Pulmonary granuloma formation in murine toxocariasis: transfer of granulomatous hypersensitivity using bronchoalveolar lavage cells. J. Parasitol. 74 (6): 950-956.

*KENNEDY, M.W.; MAIZELS, R.M.; MEGHJI, M.; YOUNG, L.; QURESHI, F.; SMITH, H.V. (1987).- Species-specific and common epitopes on the secreted and surface of Toxocara cati and Toxocara canis infective larvae. Parasit. Immunol. 9: 000-000.

*KHALIL, H.M.; ALI, O.F.; SHABRAWY, M.E.; HIFNY, N.; BEUPARS, M.A. (1976, a).- Studies on the infection with the Toxocara canis the dog ascarid among egyptians in Dakahleia Governorate. J. Egypt. Pub. Health. Ass. 51 (4): 229-232.

*KHALIL, H.M.; KHALED, M.L.M.; ARAFA, M.S.M. (1976, b).- Incidence of Toxocara canis and Toxocara cati infections among stray dogs and cats in Cairo and Giza Governates, A.R.E. J. Egypt. Pub. Health. Ass. 51 (2): 90-94.

- *KHALIL, H.M.; RIFAAT, M.A.; ABDEL AAL, T.M.; KHALED, M.L.M.; SADEK, M.S.; RIF, F.A.H. (1.976, c).-
Toxocariosis in humans and dogs of Siwa Oasis. Qena and Aswan Governates, A.R.E. J. Egypt. Pub. Healt. Ass. 51 (2): 289-296.
- *KHALIL, H.M.; KHALED, M.L.M.; OLFAT FARAG, A.; NABILAHIFNY, M.; BEBARS, M. (1.978).- Examinations of soil for Toxocara canis eggs in diferent governorates of Egypt. J. Egypt. Pub. Health Ass. 53 (5/6): 295-302.
- *KHALIL, H.N. (1977).- Toxocariasis in Egypt. J. Egypt. Pub. Health Ass. 52 (5): 330-343.
- *KHOLER, G.; JORREN, R.; KNAPEN, F. VAN (1.980).- Studies on the contamination of playground sandboxes with eggs of ascarids of carnivores. Budsgesundheitsblatt. 23 (1/2): 6-9.
- *KIM, W.B.; JO, Y.W.; CHOIT, E.C.; KIM, B.K. (1.989).- Inhibition ELISA for hepatitis B surface antigen (HBsAg) using monoclonal idiotype-antiidiotype interaction. J. Immunol. Methods. 125: 273-278.
- *KLABANOVA, V. (1.981).- Results of helminthological examinations of dogs and their hygienic-epidemiological aspects. Cesk. Epidemiol. Mikrobiol. Immunol. 30 (4): 221-226.
- *KNAPEN, F.VAN.; LEUDSEN, F.VAN.; BUYS, J. (1.982).- Serodiagnosis of toxocaral larva migrans in monkeys by enzyme-lynked immunosorbent assay (E.L.I.S.A) with somatic adult and secretory larval antigens. J. Parasitol. 68 (5): 951-952.
- *KNAPEN, F.VAN.; LEUDSEN, J.VAN.; POLDERMAN, A.M.; FRANCHIMONT, J.H. (1.983).- Visceral Larva Migrans: examinations by means of enzyme-lynked-immunosorbent-assay of human sera for antibodies to excretory-secretory antigens on the second-stage larvae of T.canis. Z. Parasitenkd. 69: 113-118.
- *KNAUS, B.U.; BETKE, P. (1.986).- Ocuurrence of Toxocara canis in dogs in the district of Cottbus, G.D.R. Ang. Parasitol. 27 (3): 169-173.
- *KOIZUMI, T.; HAYAKAWA, J.I.; KONDO, K. (1.983).- T.canis: Immunogenic sources of T.canis in infected rats. Jap. J. Parasitol. 32 (5): 379-386.
- *KOIZUMI, T.; HAYAKAWA, J.I. (1.984).- Mouse strain difference on visceral migrans of Toxocara canis. Experiment. An. 33 (3): 291-295.
- *KONDO, K.; KURIMOTO, H.; ODA, K.; SHIMADA, Y.; TANAKO, N.; FUJISAWA, K.; OTAKA, K. (1.975).- Experimental studies on "larva migrans". I- Transition of blood picture in mice infected with Toxocara canis larvae. Jap. J. Parasitol. 24 (3): 137-143.
- *KONDO, K.; SHIMADA, Y.; KURIMOTO, H. (1.976).- Experimental studies on "Visceral Larva Migrans". On resistance of mice receiving sensitization and challenge with Toxocara canis eggs Jap. J. Parasitol. 25 (5): 371-376.
- *KONDO, K.; AKAO, N.; KONISHI, Y.; YOSHIMURA, H. (1.984).- Experimental studies on visceral larva migrans. 4. Examinations of immunoglobulins in sera of infected rabbits with Toxocara canis by means of indirect fluorescent antibody (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.). Jap. J. Parasitol. 33 (2): 99-104.
- *KONDO, K.; AKAO, N.; KONISHI, Y.; YOSHIMURA, H.; HIROSE, H. (1.987).- Immuno-electron microscopic

- observation of excretory cell of Toxocara canis larva. Jap. J. Parasitol. 36 (3): 81-84.
- *KOZAKIEWICZ, B. (1.983).- Prevalence of Toxocara canis infection in dogs and its epidemiological features in urban conglomerations. Med. Wet. 39 (11): 660-663.
- *KRESINA, T.F.; OLDS, G.R. (1.989).- Antiidiotypic antibody vaccine in murine schistosomiasis mansoni comprising the internal image of antigen. J. Clinical. Investigation 83 (3): 912-920.
- *KUCHAROVA, M. (1.989).- Survey of parasitoses in dogs and cats in Prague with reference to parasitic zoonoses. Veterinárství. 39 (7): 314-316.
- *KUNKEL, H.G.; MANNIKAND, M.; WILLIAM, R.C. (1.963).- Science 140: 617.
- *KURES, L.; BIAVA, M.F.; PERCEBOIS, G. (1.980).- The dog in the city. Hookworms in canine faeces collected from various places in Nancy. An. Med. Nancy. 19: 909-914.
- I —
- *LACEY, E. (1.990).- Mode of action of benzimidazoles. Parasitology Today, 6 (4): 112-115.
- *LAEMLI, U.K. (1.970).- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 2: 680-685.
- *LEE, D.L. (1.960).- Effect of superinfection on the behaviour of Toxocara canis larvae in mice. J. Parasitol. 46: 583-588.
- *LEE, K.T.; MIN, H.K.; SOH, C.T. (1.976).- Transplacental migration of Toxocara canis larvae in experimental infected mice. J. Parasitol. 62 (3): 460-465.
- *LEE, J.I.; LEE, C.G.; KIM, O.N. (1.982).- Demonstration of helminths eggs and larvae in the soil of public places in the Kwangju area, Korea. Korean. J. Vet. Res. 22 (2): 253-258.
- *LENKAUSKAITE, C.H.L.; TSIRONKAITE, E.A.; MEIRAITI, A.I.; BOTSKO, I.O. (1.982).- Problems of epidemiology and diagnosis of Toxocara infections in Vilnius (Lithuanian SSR). Nav. Litov. Inst. Zool. Parazitol.: 145-148.
- *LEVINE, H. (1.980).- Nematode parasites of domestic animal of man. 2nd Ed. Burgess. P.C. Minneapolis, U.S.A.
- *LINDENMANN, J. (1.973).- Ann. Immunol.(Paris) 124c: 171.
- *LJUNGSTROM, I.; KNAPEN, F. VAN. (1.989).- An epidemiological and serological study of Toxocara infections in Sweden. Scand. J. Infect. Diseases. 21 (1): 87-93.
- *LLOYD, S.; SOULSBY, J.L. (1.983).- Prenatal and transmammary infections of Toxocara canis in dogs: effect of benzimidazole-carbamate anthelmintics on various development stages of the parasite. J. Small. An. 24: 763-768.
- *LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N.J.; FABRA, A.L.; RANDALL, R.J. (1.951).- Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265.
- *LUDLAM, K.E.; PLATT, T.R. (1.989).- The relationship of park maintenance and accessibility to dogs to the presence of Toxocara spp. ova in the soil. Am. J. Public. Health. 79 (5): 633-634.
- *LUGETTI, G.; BOTTONE, U.; ORLANDI, M.; CAMPO, M. (1.978).- Adherence reaction technique for the detection of Toxocara canis antibodies. Rev. Parasitol. 39 (2/3): 187-192.

- *LUKES, S.; PROKOPIC, J. (1984).- Comparison of conserimmuno-electrophoresis with indirect haemagglutination test in the detection of antibodies in rabbits experimentally infected with various species of ascarids. Fol. Parasitol. 31: 157-162.
- *LYNCH, N.R.; WILKES, L.K.; HODGEN, A.H.; TURNER, K.J. (1988, a).- Specificity of Toxocara E.L.I.S.A. in tropical populations. Parasit. Immunol. 10: 323-337.
- *LYNCH, N.R.; EDDY, K.; NEILL HODGEN, A.; LOPEZ, R.I.; TURNER, K.J. (1988, b).- Seroprevalence of Toxocara canis infection in tropical Venezuela. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 82: 275-281.

—M—

- *MACCHIONI, G.; MARCONCINI, A. (1967).- Metodiche di accertamento standard della microascaridiosi sperimentale da T. canis (Werner, 1982) nel topo bianco. Curve di migrazione larvale viscerale e somatica in corso d'infestazione sperimentale realizzata mediante conferimento dell'inoculum attraverso le vie orale, intraperitoneale e sottocutanea. Atti. Soc. Ital. Sci. Vet. 20: 1-18.
- *MADWAR, M.A.; KABIL, S.M.; HAMADTO, H.A.; FARRAGE, A.K. (1986).- Prevalence of soil contamination by Toxocara canis eggs in Qulubiya Governorate. J. Egypt. So. Parasitol. 16 (1): 105-109.
- *MAGNAVAL, J.F. (1982).- Traitement des Larva Migrans Viscerales par le fluorobendazole. Résultats préliminaires chez trente malades. La nouvelle Presse Médicale 11 (17): 1.338.
- *MAGNAVAL, J.F.; CHARLET, J.P. (1987).- Comparative efficiency of thiabendazole and mebendazole in the therapy of toxocariasis. Thérapie 42 (6): 541-544.
- *MAIZELS, R.M.; MEGHJI, M. (1984).- Repeated patent infection of adult dogs with Toxocara canis. J. Helminthol. 58: 327-333.
- *MAIZELS, R.M.; SAVIGNY, D.D.E.; OGILVIE, B.W. (1984).- Characterization of surface and excretory-secretory antigens of Toxocara canis infective larvae. Parasit. Immunol. 6 (1): 23-27.
- *MAIZELS, R.M.; KENNEDY, M.W.; MEGHJI, M.; ROBERTSON, B.D.; SMITH, H.V. (1987).- Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens of the parasitic nematode Toxocara canis. J. Immunol. 139 (1): 207-214.
- *MALLOY, W.F.; EMBIL, J.A. (1978).- Prevalence of Toxocara spp. and other parasites in dogs and cats in Halifax, Nova Scotia. Can. J. Comp. Med. 42: 29-31.
- *MARAYUMA, H.; HIGA, A.; ASAMI, M.; OWHASKI, M.; NAWA, Y. (1991).- Hepatic eosinophilopoiesis from potent stem cells in Toxocara canis infected mice. Exp. Hematol. 19: 77-80.
- *MARMOR, M.; GLICKMAN, L.; SCHOFER, F.; FAICH, L.A.; ROSENBERG, C.; CORNBLATT, B.; FRIEDMAN, S. (1987).- Toxocara canis infection of children: epidemiologic and neuropsychologic findings. Am. J. Pub. Health. 77 (5): 554-559.
- *MARRON, J.A.; SCHROEDER, R.J. (1978).- Survey of Toxocara canis infection rate in impounded dog in Los Angeles country. J. Am. Vet. Med. Ass. 172 (6): 713.
- *MARVAL, H.; MARVAL, M.J.DE. (1979).- Toxocariasis experimental (Larva migrans) en ratones C57BL. Rev.

- *MASI, I.; GENCHI, C.; LOCATELLI, A. (1986).- Experimental chronic inflammation and larval migration of Toxocara canis in the rat. Parassitologia 28: 284-285.
- *MATSUMURA, K.; ENDO, R.; NAKASHIMA, Y. (1981, a).- Evaluation of hatching methods for Toxocara canis larvae. Yam. J. Vet. Med. 8: 61-62.
- *MATSUMURA, K.; ENDO, R.; NAKASHIMA, Y. (1981, b).- A survey on Toxocara canis infection of puppies in Yamaguchi Prefecture. Yam. J. Vet. Med. 8: 63-64.
- *MATSUMURA, K.; ENDO, R. (1982, a).- Investigation of antibodies against Toxocara canis in naturally infected puppies. Bak. Hyg. I. Abt. Orig. 253: 139-143.
- *MATSUMURA, K.; ENDO, R. (1982, b).- Enzyme-linked immunosorbent assay for toxocariasis, its application to the sera of children. Zbl. Bakt. Hyg. 253: 402-406.
- *MATSUMURA, K.; ENDO, R. (1983).- Seroepidemiological study on toxocaral infection in man by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Hyg. Camb. 90: 61-65.
- *MATSUMURA, K.; KAZUTA, Y.; ENDO, R.; TANAKA, K. (1984).- Detection of circulating toxocaral antigens in dogs by sandwich enzyme-immunoassay. Immunology 51: 609-613.
- *MATSUMURA, K.; KAZUTA, Y.; ENDO, R.; TANAKA, K.; INOUE, T.; MATSUDA, H. (1987).- A rapid detection of toxocaral antibodies by Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-E.L.I.S.A.) in dogs. Zbl. Bakt. Hyg. A. 266: 580-585.
- *MEGHJI, M.; MAIZELS, R.M. (1986).- Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode Toxocara canis. Mol. Biochem. Parasitol. 18: 155-170.
- *MIKOLASOVA, B.; BOZDECH, V.; VANDASOVA, D.; KORBELOVA, A.; MERHAUT, J. (1981).- Importance of Toxocara infections in man. Sbor. Lek. 83 (8/9): 244-245.
- *MIKULIC, V.D.; VAZIC-BABIC, V. (1986).- Prevalence of Toxocara antibodies in persons with eosinophilia. Giornale Malattie Infett. Parassit. 38 (16): 567-568.
- *MILLER, T.A. (1971).- Vaccination against the canine hookworm disease. Adv. Parasitol. 9: 153-183.
- *MIN, H.K.; LEE, K.T.; SOH, C.T. (1974).- Experimental study on transplacental transmission of Toxocara canis larvae in mice. Kor. J. Parasitol. 12 (1): 79-80.
- *MIN, H.K. (1976).- Comparative observations on the intra-mammary migration of Toxocara canis and Ancylostoma caninum infected mice. Yon. Rep. Trop. Med. 7 (1): 68-73.
- *MIN, H.K. (1978).- Study of infectivity of Toxocara canis eggs from soil. Ew. Med. J. 1 (4): 239-242.
- *MIN, H.K. (1982).- Migratory behaviour of Toxocara canis larvae in the brain of mice with special reference to distribution. Ewh. Med. J. 5 (4): 201-206.
- *MITCHELL, G.F.; CRUISE, K.M.; CHAPMAN, C.B.; ANDERS, R.F.; HOWARD, M.C. (1979).- Hybridoma antibody immunoassays for the detection of parasitic infection: development of a model system using a larval cestode infection in mice. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 57: 287-302.
- *MOLK, R. (1982).- Treatment of toxocaral optic neuritis. J. Clin. Neuro-Ophthalmol. 2 (2): 109-112.
- *MOLK, R. (1983).- Ocular toxocariasis: a review of the literature. Ann. Ophthalmol. 15: 216-219.

- *MORETTI, A.; PIERGILI FIORETTI, D. (1.989).- Environmental and seroepidemiological study of the distribution of Toxocara spp. in the city of Perugia, Italy. Rev. Iber. Parasitol. 48 (4): 365-371.

—N—

- *NAGAKURA, K.; TACHIBANA, H.; KANEDA, Y.; KATO, Y. (1.989).- Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. J. Infect. Dis. 160 (4): 735-736.
- *NICHOLAS, W.L.; STEWART, A.C. (1.979).- The action of benzimidazoles on the larval stages of Toxocara canis in the mouse. Ann. Trop. Med. Parasitol. 73: 57-62.
- *NICHOLAS, W.L.; STEWART, A.C.; MITCHELL, G.F. (1.984).- Antibody responses to Toxocara canis using sera from parasite infected mice and protection from Toxocariasis by immunization with E/S antigens. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 62 (5): 619-626.
- *NICHOLAS, W.L.; STEWART, A.C.; WALKER, J.C. (1.986).- Toxocariasis: a serological survey of blood donors in the Australian capital territory together with observations on the risks of infection. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 80: 217-221.
- *NICHOLS, R.L. (1.956).- The etiology of visceral larva migrans. I-Diagnostic morphology of infective second-stage Toxocara canis larvae. J. Parasitol. 42 (4): 349-362.

—O—

- *OAKS, J.A.; KAYES, S.G. (1.979).- Artificial hatching and culture of Toxocara canis second stage larvae. J. Parasitol. 65 (6): 969-970.
- *O'CONNOR, G.R. (1.980).- Chemotherapy of toxoplasmosis and toxocariosis. Oc. Therap. Ed: Srinivasan B.D. New York, USA, Masson Publishing USA, Inc.: 51-57.
- *OKADA, S. (1.970).- Cells. Radiation biochemistry. Vol.I, K.I. Altman., G.B. Gerber and S. Okada (eds). Academic Press. New York.
- *OKOSHI, S.; USUI, M. (1.968).- Experimental studies on Toxascaris leonina. VI-Experimental infection of mice, chickens and earthworms with Toxascaris leonina, Toxocara canis and Toxocara cati. Jap. J. Vet. Sci. 30: 151-166.
- *OLSON, L.J. (1.960).- Serology of visceral larva migrans: in vitro larval precipitate test. Tex. Rep. Biol. Med. 18 (3): 473-479.
- *OLSON, J.L. (1.962, a).- Organ distribution of Toxocara canis larvae in normal mice previously infected with Toxocara, Ascaris or Trichinella. Texas. Rep. Biol. Med. 20: 651-657.
- *OLSON, L.J. (1.962, b).- Organ distribution of Toxocara canis larvae and lesions. Int. J. Parasitol. 6: 247-251.
- *OLSON, L.J.; IZZAT, N.N.; PETTEWAY, M.B.; REINHART, J.A. (1.970).- Ocular Toxocariasis in mice. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 19 (2): 238-243.
- *OLSON, L.J.; JONES, F.R. (1.974).- Preparation of sterile Toxocara canis larvae. J. Parasitol. 60 (6):

- *OLSON, L.J.; SCHULZ, C.W. (1980).- Nematode induced hypersensitivity reactions in guinea pigs: onset of eosinophilia and positive schultz-dale reactions following graded infections with Toxocara canis. Ann. N. Y. Ac. Sci.: 440-455.
- *ORTEGA-PIERRES, G.; MACKENZIE, C.D.; PARKHOUSE, R.M.E. (1984).- Protection against T.spiralis induced by a monoclonal antibody that promotes killing of newborn larvae by granulocytes. Parasit. Immunol. (6): 275-284.
- *OSHIMA, T. (1960).- Standardization of techniques for infecting mice with Toxocara canis and observations on the normal migration routes of the larvae. J. Parasitol. 47: 652-656.
- *OSHIMA, T. (1983).- Role and behaviour of eosinophils in parasitic infections as observed in mice infected with Toxocara canis. Proc. S. E. Asian. Parasitol. Symposium. Hong Kong. Diciembre, 1983.
- *OUCHTERLONY, O. (1953).- Antigen antibody reactions in gels IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. Acta Path. Microbiol. Scand. 32: 231-240.
- *OUDIN, J.; MITCHEL, M. (1963).- C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. 257: 805.
- P -
- *PACKER, D.E.; ALL, T.M. (1986).- Echinococcus granulosus in dogs in Lybia. An. Trop. Med. Parasitol. 80 (1): 137-139.
- *PAHARI, T.K.; SASMAL, N.K. (1990).- Experimental infection of mice with Toxocara canis larvae obtained from Japanese quails. Int. J. Parasitol. 20 (2): 263-264.
- *PAL, M.; NAIR, R.P.N.; DUBE, G.D. (1979).- Prevalence of helminth parasites in the pet dogs of Delhi Metropolitan area. Liv. Adv. Ban. India. 4: 25-28.
- *PALOMO, C.; ALBAR, J.P.; GARCIA-BARRENO, B.; MELERO, J.A. (1990).- Induction of neutralizing immune response to human respiratory syncytial virus with anti-idiotypic antibodies. J. Virology. 4.199-4.206.
- *PAPPAS, M.G.; HAJKOWSKI, R.; HOCKMEYER, W.T. (1983).- Dot-enzyme linked immunosorbent assay (Dot-E.L.I.S.A.): a microtechnique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. J. Immunol. Meth. 64: 205-214.
- *PARSONS, J.C.; BOWMAN, D.D.; GRIEVE, R.B. (1989).- Pathological and haematological responses of cats experimentally infected with Toxocara canis larvae. Int. J. Parasitol. 19 (5): 479-488.
- *PARSONS, J.C.; GRIEVE, R.B. (1990, a).- Effect of dosage and host genotype on liver trapping in murine larval toxocariasis. J. Parasitol. 76 (1): 53-58.
- *PARSONS, J.C.; GRIEVE, R.B. (1990, b).- Kinetics of liver trapping of infective larvae in murine toxocariasis. J. Parasitol. 76 (4): 529-536.
- *PAUL, A.J.; TODD, K.S. Jr; DIPIETRO, J.A. (1988).- Environmental contamination by eggs of Toxocara species. Vet. Parasitol. 26 (3-4): 339-342.
- *PEAKER, M.; LINSELL, J.C. (1975).- Salt gland in birds and reptiles. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

- *PEGG, E.J. (1.975).- Dog roundworms and public health. Vet. Rec. 97 (4): 78.
- *PERCY, A.J.; HARN, D.A. (1.988).- Monoclonal anti-idiotypic and anti-anti-idiotypic antibodies from mice immunized with a protective monoclonal antibody against Schistosoma mansoni. J. Immunol. 140 (8): 2.760-2.762.
- *PERRIN, J.; BERNARD BOXERBAUM, M.D.; CARL, F.; DOERSHU, M.D. (1.975).- Thiabendazole treatment of presumptive visceral larva migrans. Clin. Pediat. 14 (2): 147-150.
- *PETITHORY, J.C.; DEROUIN, F.; ROUSSEAU, M.; LUFFAU, M.; QUEDOC, M. (1.987).- Serological arguments for multiple etiology of visceral larva migrans. Helminth zoonoses. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Netherlands.: 183-191.
- *PETITHORY, J.C.; LIOTET, S.; CHAUMEIL, C.; MOISAN, F.; BEDDOK, A.; BATELLIER, L.; BRUMPT, L.C. (1.990).- Le syndrome de larva migrans oculaire. Rev. Franc. Labor. 1990 (207): 69-80.
- *PETITHORY, J.C. (1.990).- Diagnostic immunologique du syndrome de larva migrans oculaire. Ophtalmologie 4: 298-300.
- *PETITHORY, J.C.; ARDOIN, F. (1.990).- Prevalence en France et en Italie de Toxocara canis et autres helminthes chez le chien en 1.987-1.989. Bull. Soc. Franc. Parasitol. 8 (2): 257-266.
- *PETRICH, J.; STOVE, M. (1.981).- Effect of various benzimidazole carbanates on somatic larvae of Ancylostoma caninum (Ancylostomidae) and Toxocara canis (Anisakidae). 3. Immunofluorescence serological studies on the titre levels of treated and untreated dogs. Ze. Vet. Med. 28 (4): 292-300.
- *PIERGILI FIORETTI, D.; BALDELLI, F.; POLIDORI, G.A.; AMBROSI, M. (1.978).- Il micrometodo E.L.I.S.A. applicato allo diagnosi di Trichinosi umana in un episodio morboso verificatosi in Emilia. Boll. Soc. It. Biol. Sper. 54: 224-228.
- *POLDERMAN, A.M.; VRIES, H.DE.; VAN DE WATER, P.M. (1.980).- Serological diagnosis of Toxocariasis. The use of larval antigens in the E.L.I.S.A. Ac. Leiden 48 :37-42.
- *POLLARD, Z.F. (1.979). Ocular Toxocara in siblings of two families. Diagnosis confirmed by E.L.I.S.A. test. Arch. Ophthalmol. 97 :2.319-2.320.
- *POTOCNJAK, P.; YOSHIDA, N.; NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, V. (1.980).- Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malaria infection. J. Exp. Med. 151: 1.504.
- *POYNTER, D. (1.964).- Commercial production of an irradiated vaccine against helminth diseases. Int. Atom. Energ. Ag., Technical report series. 30, Vienna, :17-23.
- *PROCIV, P. (1.985).- Observation on Toxocara pteropodis infections in mice. J. Helminthol. 59 (3): 267-275.
- *PROCIV, P.; BRINDLEY, P.J. (1.986).- Oral, parenteral and paratenic infections of mice with Toxocara pteropodis. Int. J. Parasitol. 16 (5): 471-474.
- *PROCIV, P. (1.989, a).- Observations on the postmortem migration of nematode larvae and its role in tissue digestion techniques. J. Helminthol. 63 (4): 281-286.
- *PROCIV, P. (1.989, b).- Observations on eggs production by Toxocara pteropodis. Int. J. Parasitol. 19

(4): 441-443.

*PROCIV, P. (1.990).- Observations on the morphology of Toxocara pteropodis eggs. J. Helminthol. 64: 271-277

*PROKOPIC, J.; FIGALLOVA, V. (1.982, a).- Migration of some roundworm species in experimentally infected white mice. Fol. Parasitol. 29 (4): 309-313.

*PROKOPIC, J.; FIGALLOVA, V. (1.982, b).- Eosinophilia in white mice infected experimentally with Toxocara and subsequently with Ascaris. Vet. Medicin. 27 (6): 359-362.

*PROKOPIC, J.; FIGALLOVA, V. (1.983).- Changes in the blood picture of white mice experimentally infected with various species of Ascarids. Fol. Parasitol. 30: 185-188.

*PRZYJALKOWSKI, Z.; ZAPART, W.; STARZYNSKI, S. (1.978).- Investigation of intravital diagnosis of Toxocara canis larva migrans in experimentally infected mice. Bull. L'Acad. Pol. Sci. 26 (12): 875-880.

- Q -

*QUINN, R.; SMITH, H.V.; BRUCE, R.G.; GIRWOOD, R.W.A. (1.980).- Studies on the incidence of Toxocara and Toxascaris spp ova in the environment. I. A comparison of flotation procedures for recovering Toxocara spp. ova from soil. J. Hyg. 84 (1): 83-89.

*QUIROZ, H. (1.984).- Parasitología y enfermedades parasitarias en animales domésticos. Ed. Linusa.

- R -

*RAHMAN, W.A. (1.990).- Intestinal helminths of pet dogs from a residential area in Penang, Malaysia. Trop. Biomed. 7: 195-196.

*RAPIC, D.; DZAKULA, N.; STOJCEVIC, D. (1.983).- Contamination of public places in Zagreb with ova of Toxocara and other helminths. Vet. Arch. 53 (5): 233-238.

*READ, M.A.; THOMPSON, R.C.A. (1.976).- Prevalence of Toxocara canis and Toxascaris leonina ova in dog faeces deposited on the streets of Leeds. J. Helminthol. 50 (2): 95-96.

*RECCO, P.; BUSCAIL, L.; ROQUES, C.; RIBET, A.; SEGUELA, J.P. (1.988).- Faut-il traiter les syndromes de Larva migrans par les anthelminthiques? Résultats d'un suivi de 70 patients. Bull. Soc. Fr. Parasitol. 6: 69-72.

*REE, G.H.; VOLLER, A.; ROWLAND, H.A.K. (1.984).- Toxocariasis in the British Isles. 1982-83. Brit. Med. J. 288: 628-629.

*REP, B.H. (1.980).- Roundworm infection in dogs in the Netherlands. Tij. V. Dieg. 105 (7): 282-289.

*RHODIN, J. (1.956).- Int. Rev. Cytol. 7: 485-499.

*RICHARDS, B.; OLSON, L.J.; BOX, Q.T. (1.962).- Survey of Galveston children for antibodies to Toxocara canis. J. Parasitol. 48 (3): 501.

*RIERA, C.; PORTUS, M.; PRATS, G. (1.985).- La técnica E.I.A. en el diagnóstico serológico de la "larva migrans" visceral humana. IV Cong. Nal. Parasitol. Tenerife, Julio, 1985.

- *RIERA, C.; MUÑOZ, C.; PORTUS, M.; PRATS, G. (1.987, a).- Puesta a punto de una técnica E.L.I.S.A para la detección de anticuerpos anti-Toxocara. Ensayo en modelo experimental murino y su aplicación en el diagnóstico de la "larva migrans" visceral humana. Rev. Iber. Parasitol. Vol Ext.: 219-224.
- *RIERA, C.; PORTUS, M.; PRATS, G. (1.987, b).- Detección de anticuerpos anti-Toxocara (IgG, IgM, IgA e IgE) mediante E.L.I.S.A utilizando antígeno de excreción-secreción de larvas II de T. canis. V Cong. Nac. Parasitol. Salamanca, Septiembre, 1.987: 305-306.
- *RIERA, C.; PORTUS, M. (1.988).- Diagnóstico de la Toxocariasis humana mediante E.L.I.S.A. con antígeno excretor-secretor de larvas II de Toxocara canis. Rev. Iber. Parasitol 48 (1): 95-100.
- *ROBERTS, J.A. (1.990).- The life cycle of Toxocara vitulorum in asian buffalo (Bubalus bubalis). Int. J. Parasitol. 20 (7): 833-840.
- *ROBERTSON, B.D.; BURKOT, T.R.; GILLESPIE, S.H.; KENNEDY, M.W.; WANBAI, Z.; MAIZELS, R.M. (1.988).- Detection of circulating and specific antibody in Toxocara canis infections. Clin. Exp. Immunol. 74 (2): 236-241.
- *ROBERTSON, B.D.; BIANCO, A.E.; MCKERROW, J.H.; MAIZELS, R.M. (1.989).- Toxocara canis: proteolytic enzymes secreted by the infective larvae in vitro. Exp. Parasitol. 69 (1): 30-36.
- *ROBINSON, R.D.; THOMPSON, D.L.; LINDO, J.F. (1.989).- A survey of intestinal helminths of well-cared for dogs in Jamaica and their potential public health significance. J. Helminthol. 63 (1): 32-38.
- *ROCKEY, J.H.; DONNELLY, J.J.; STROMBERG, B.E.; SOULSBY, E.J.L. (1.979).- Immunopathology of Toxocara canis and Ascaris suum infections of the eye: the role of the eosinophils. Invest. Ophthalmol. Visual. Sci. 18 (11): 1.172-1.184.
- *ROCKEY, J.H.; DONNELLY, J.J.; STROMBERG, B.E.; SOULSBY, E.J.L. (1.981).- Immunopathology of ascarid infection of the eye. Role of IgE antibodies and mast cells. Arch. Ophthalmol. 99: 1831-1840.
- *RODRIGUEZ-BURGOS, A. (1.961).- Estudio inmunológico sobre la somatoascariosis. Aportación de un nuevo método para el diagnóstico especie-específico. Rev. Iber. Parasitol. 21: 463-504.
- *ROE, J.H. (1.955).- The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. J. Biol. Chem. 212: 335-343.
- *ROITT, I.M. (1.986).- Inmunología esencial. 6ª Ed. JIMS, S.A.
- *ROMBERT, P.C. (1.987).- Diagnosis of Visceral Larva Migrans by ELISA. Comparison of two antigens. Rev. Iber. Parasitol. 47 (4): 397-401.
- *RUITENBERG, E.J.; BUYS, J. (1.976).- An immunofluorescence technique for the detection of Toxocara canis antibodies. Vet. Parasitol. 1: 231-237.
- *RUITENBERG, E.J.; KNAPEN, F.VAN. (1.977).- The enzyme-linked immunosorbent assay and its applications to parasitic infections. J. Infect. Dis. 136. (Supplement): 5267-5273.

- *SACKS, D.L.; ESSER, K.W.; SHER, A. (1.982).- Immunization of mice against african trypanosomiasis using antiidiotypic antibodies. J. Exp. Med. 155: 1.108-1.119.
- *SALEH, F.C.; KIRKPATRICK, C.E.; HASETH, O.D.E.; LOK, J.B. (1.988).- Occurence of some blood and intestinal parasites in dogs in Curaçao, Netherlands Antilles. Trop. Geog. Med. 40 (4): 318-321.
- *SALINAS, P.; REYES, L.; SOTOMAYOR, M.T.; LETONJA, T. (1.987).- Prevalence of eggs of Toxocara in some public playgrounds in the metropolitan region of Santiago, Chile. Bol. Chil. Parasitol. 42 (1-2): 33-36.
- *SAMANTA, S.; ANSARI, M.Z.; SAHAI, B.N. (1.989).- Prevalence of Toxocara canis in dogs in and around Ranchi, Bihar. J. Research, Birsa Agricultural University 1 (2): 201-203.
- *SAVIGNY, D.H. DE (1.975).- In vitro maintenance of Toxocara canis larvae and a simple method for the production of Toxocara E/S antigen for the use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. J. Parasitol. 61 (4): 781-782.
- *SAVIGNY, D.H. DE; VOLLER, A.; WOODRUFF, A.W. (1.979).- Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. J. Clin. Pathol. 32: 284-288.
- *SCAGLIA, M.; GATTI, S.; BRUNO, A.; CEVINI, C.; CHICHINO, G.; MAGNANI, B.; BRUSTIA, R. (1.989).- Larva migrans viscérale et oculaire: étude épidémiologique et immunologique portant sur 20 cas, adults et enfants. Bull. Soc. Path. Exot. 82: 410-421.
- *SCHAEFFERT, R.H.; STRAUCH, D. (1.979).- Naturally infected dog droppings from public parks and playgrounds as a possible source of infection with salmonellae and helminths. Ann. Int. Sup. Sa. 14 (2): 295-300.
- *SCHANDEVYL, P.; MBUNDH, T.; SUMBU, W. (1.987).- Prevalence of intestinal parasites in Kinsasa, Zaire. An. Soc. Bel. Med. Trop. 67 (4): 369-374.
- *SCHANTZ, P.M.; MEYER, D.; GLICKMAN, L.T. (1.979).- Clinical, serological and epidemiological characteristics of ocular toxocariasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28 (1): 24-28.
- *SCHIMEK, R.A.; FEREZ, W.A.; CARRERA, G.M. (1.979).- Ophthalmic manifestations of Visceral Larva migrans. Ann. Ophthalmol. 11: 1.387-1.390.
- *SCHMIDT, G.D.; ROBERTS, L.S. (1.984).- Fundamentos de Parasitología. Comp. Ed. Continental. México.
- *SCHUMUNIS, G.A.; PACHECO, G. (1.970).- Resistance of mice to superinfection with Toxocara canis. J. Parasitol 56 (4 Sect 2): 306-307.
- *SCHWARTZ, B. (1.939).- Freedom from viable trichinae of frankfurters prepared under Federal meat inspection. Proc. Helm. Soc. Wash. 6: 35-37.
- *SHAKAROV, A.G.; STEPANKOVSKAYA, L.P.; SITOV, K.E.; RAKHIMOV, A.T.; BABAEVA, R.I.; DZHUMAEV, I.A. (1.988).- Seroepidemiological characteristics of a focus of hydatidosis in the Uzbek. SSR. Med. Parasitol. Parazyt. Bolez. 5: 50-54.
- *SHARMA, S.C.; BHATIA, B.B. (1.983).- Migratory behaviour and pathology of Toxocara canis larvae in chickens and albino mice. Ind. J. Parasitol. 7 (1): 33-39.

- *SHARP, A.D.; OLSON, L.J. (1.961).- Hipersensitivity responses in Toxocara, Ascaris, and Trichinella infected guinea pigs to homologous and heterologous challenge. J. Parasitol. 46 (3): 362-367.
- *SHIELDS, J.A.; LERNER, H.A.; FELBERG, N.T. (1.977).- Aqueous cytology and enzymes in nematode endophthalmitis. Am. J. Opth. 84 (3): 319-322.
- *SHOOP, W.L. (1.991).- Vertical transmission of helminths. Parasitology Today. 7 (2): 51-54.
- *SIMON, M.F.; CONDE, G.L. (1.987).- Datos epidemiológicos sobre la toxocarosis y larva visceral emigrante en la provincia de Salamanca. V Cong. Nac. Parasitol. Salamanca, Septiembre 1.987: 237-238.
- *SIVACHELVAN, M.N.; MUNASINGHE, N.B. (1.988).- Toxocara vitulorum (Goeze, 1782) larval invasion into skeletal musculature of mice. Trop. Vet. 4 (3-4): 159-162.
- *SIXL, W. (1.975).- Ticks and worm eggs of dogs and cats in the Steiermark (Austria) (Arachnida; Nematoda). Mit. Abt. Zool. Land. Mus. Joan. 4 (1): 59-60.
- *SMALL, K.W.; MCCUEN, B.W.; DE JUAN, E.; MACHEMER, R. (1.989).- Surgical management of retinal traction caused by toxocariasis. Am. J. Opth. 108 (1): 10-14.
- *SMITH, H.V.; QUINN, R.; BRUCE, R.G.; GIRWOOD, R.W.A. (1.980).- A paper radioimmunosorbent test (P.R.I.S.T.) for the detection of larva-specific antibodies to Toxocara canis in human sera. J. Immunol. Meth. 37: 47-55.
- *SMITH, H.V.; QUINN, R.; KUSEL, J.R.; GIRWOOD, R.W.A. (1.981).- The effect of temperature and antimetabolites on antibody binding to the outer surface of second stage Toxocara canis larvae. Mol. Biochem. Parasitol. 4: 183-193.
- *SMITH, H.V.; QUINN, R.; BRUCE, R.G.; GIRWOOD, R.W.A. (1.982).- Development of the serological response in rabbits infected with Toxocara canis and Toxascaris leonina. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 76 (1): 89-94.
- *SMITH, H.V.; KUSEL, J.R.; GIRWOOD, R.W.A. (1.983, a).- The production of human A and B blood group like substances by in vitro maintained second stage Toxocara canis larvae: their presence on the outer larval surfaces and their excretions-secretions. Clin. Exp. Immunol. 54: 625-633.
- *SMITH, H.V.; QUINN, R.; BRUCE, R.G.; GIRWOOD, R.W.A. (1.983, b).- Antigenic heterogeneity in some Ascaroidea (Nematoda) and medical importance. I Analysis of adult nematodes. Act. Parasitol. Pol. 23 (48): 459-465.
- *SMITH, H.V.; QUINN, R.; BRUCE, R.G.; GIRWOOD, R.W.A. (1.983, c).- Antigenic heterogeneity in some Ascaroidea (Nematoda) of medical importance. II Analysis of development stages. Act. Parasitol. Pol. 28 (49): 467-476.
- *SMITH, H.V. (1.989).- A rapid method for hatching infective eggs of Toxocara canis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 83 (2): 215.
- *SMITH, R.E.; MAESTRO, H.V.; BEARD, G.B. (1.984).- Visceral larva migrans: a risk assessment in Baton Rouge, Louisiana. Int. J. Zoon. 11: 189-194.
- *SNYDER, C.H. (1.961).- Visceral Larva migrans. Ten year's experience. Pediatrics 28: 85-91.

- *SNOW, K.R.; BALL, S.J.; BENICK, J.A. (1.987).- Prevalence of Toxocara species eggs in the soil of five east London parks. Vet. Rec. 120 (3): 66-67.
- *SOILEV, C; SELEVA, R.; TODOROV, T.; VOTOVA, K. (1.984).- Prevalence of Toxocara canis in puppies in Bulgaria. Angew. Parasitol. 25 (2): 93-96.
- *SOKAL, R.R.; NOLF, F.J. (1.979).- Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. Ed. Blume. Madrid.
- *SPRENT, J.F.A. (1.952).- On the migratory behaviour of the larvae of various Ascarids species in white mice. J. Inf. Diseases. 90: 165-176.
- *SOBOTA, K.; KOTULIAKOVA, M.; SOBOTOVA, O.; KRCMEKY, V. (1.988).- Our experiences in the clinic and treatment of larval toxocarosis. Helminthologia 25 :61-67.
- *SONNEN, P. (1.979).- The chemotherapeutic susceptibility of inhibited larvae of Ancylostoma caninum Ercolani 1.859 (Ancylostomidae) and Toxocara canis, Wernw 1.782 (Anisakidae). Inaug.-Dissert. Tierärztl. Hochschule, Hann.: 69.
- *SOULSBY, E.J.L. (1.982).- Helminths, arthropods, and protozoa of domesticated animals. 7th Ed. Bailliere Tindall. London.
- *SPEISER, F.; GOTTSTEIN, B. (1.984).- A collaborative study on larval E-S antigens of Toxocara canis for the immunodiagnosis of human Toxocariasis with E.L.I.S.A. Act. Trop. 41: 361-372.
- *SPRENT, J.F.A. (1.953).- On the migratory behaviour of the larvae of various Ascaris species in white mice. II Longevity of encapsulated larvae and their resistance to freezing and putrefaction. J. Inf. Dis. 92: 114-117.
- *STEIN, K.E.; SODERSTROM, T. (1.984).- Neonatal administration of idiotypic or anti-idiotypic primes for protection against Escherichia coli K13 infection in mice. J. Exp. Med. 160: 1.001-1.011.
- *STEVENSON, P; JACOBS, D.E. (1.977).- Toxocara infection in pigs. The use of indirect fluorescent antibody tests and an "in vitro" larval precipitate test for detecting specific antibodies. J. Parasitol. 51: 149-154.
- *STEWART, G.L.; REDDINGTON, J.J.; SMITH, W.G. (1.979).- Intestinal helminth parasites of dogs from Tarrant country. Texas. Southwest. Vet. 32 (1): 29-32.
- *STOBERNACK, H.P. (1.988).- Trials with intraperitoneally implanted second-stage larvae in diffusion chambers for the immunization of dogs against Toxocara canis. (Ascarididae). Inaug.-Dissert. Tierärztl. Hochschule, Hann., German Federal Republic, 11 pp.
- *STOVE, M.; VORBOHLE, H.J. (1.985).- Effect of fenbendazole on inhibited somatic larvae of Toxocara canis in the pregnant bitch. Z. Veterinärmed. B 32 (9): 637-651.
- *STURCHLER, D.; SCHUBARTH, P.; GUALZATA, M.; GOTTSTEIN, B.; OETTLI, A. (1.989).- Thiabendazole vs. albendazole in treatment of toxocariasis: a clinical trial. Ann. Trop. Med. Parasitol. 83 (5): 473-478.
- *SUGANE, K.; OSHIMA, T. (1.980).- Recovery of large number of eosinophils from mice infected with Toxocara canis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29 (5): 799-802.
- *SUGANE, K.; OSHIMA, T. (1.982).- Eosinophilia, granuloma formation and migratory behaviour of larvae in

the congenitally athymic mouse infected with Toxocara canis. Parasit. Immunol. 4 (5): 307-319.

- *SUGANE, K.; OSHIMA, T. (1983).- Purification and characterization of secretory antigen of Toxocara canis larvae. Immunology 50: 113-120.
- *SUGANE, K.; OSHIMA, T. (1984, a).- Interrelationship of eosinophilia and IgE antibody production to larval E/S antigen in Toxocara canis infected mice. Parasit. Immunol. 6: 409-420.
- *SUGANE, K.; OSHIMA, T. (1984, b).- Induction of peripheral blood eosinophilia in mice by excretory and secretory antigen of Toxocara canis larvae. J. Helminthol. 58: 143-147.
- *SUGANE, K.; OSHIMA, T. (1985).- Induction of a marked eosinophilia by cyclophosphamide in Toxocara canis infected SJL mice. Parasit. Immunol. 7: 255-263.
- *SUGANE, K.; HOWELL, M.J.; NICHOLAS, W.L. (1985).- Biosynthetic labelling of the excretory and secretory antigens of Toxocara canis larvae. J. Helminthol. 59 (2): 147-151.
- *SUGANE, K.; MATSUMURA, T. (1987).- Eosinophilia in chimeric mice infected with Toxocara canis. J. Helminthol. 61: 157-162.
- *SURGAN, M.H.; COLGAN, K.B.; KENNETT, S.T.; PAFFMAN, J.V. (1980).- A survey of canine toxocariasis and toxocaral soil contamination in Essex county, New Jersey. Am. J. Pub. Health. 70 (11): 1.207-1.208.

— T —

- *TANAKA, K.; KAWAMURA, H.; TOHGI, N.; TSUJI, M.; MIYACHI, Y.; MIYOSHI, A. (1983).- The measurement of Ascaris suum protein by radioimmunoassay in sera from patients with helminthiasis and with gastrointestinal diseases. Parasitology. 86: 291-300.
- *TARRAB HAZDAI, R.; LEVI-SCHAPFER, V.; BRENNER, V.; HOROWITZ, S.; ESHHAR, Z.; ARNON, R. (1985).- Protective monoclonal antibody against S. mansoni: antigen isolation, characterization and suitability for active immunization. J. Immunol. 135 (4): 2.772-2.779.
- *THARALDSEN, J. (1982).- Parasitic organisms from dogs and cats in sandpits of nursery schools in Oslo. Nor. Vet. 94 (4): 251-254.
- *THARALDSEN, J. (1983).- On the prevalence on Norway. Information 17, Abo Akademi, Finland.
- *TOHGI, N.; TANAKA, K.; KAWAMURA, H.; MIYACHI, Y.; TSUJI, M. (1983).- The employment of radioimmunoassay for the detection of Ascaris suum antibody in sera from patients with ascariasis. Jap. J. Parasit. 32 (1): 63-70.
- *TONGSON, M.S.; DAYRIT, A.M. (1975).- Effect of tetraisoole on the somatic Toxocara canis larvae in white rats. Philippin. J. Vet. Med. 15 (2): 53-64.
- *TÖNZ, M.; SPEISER, F.; TÖNZ, O. (1983).- Toxocariasis bei schweizer kinder. Schweiz. Med. Wschr. 113 (41): 1500-1507.
- *TRIBOULEY-DURET, J.; TRIBOULEY, J.; APRIOU, M.; TESSIER, J.M. (1976).- Mise en evidence d'anticorps au cours de la toxocarose experimentale a l'aide d'un extrait antigenique prepare a partir du parasit adult. Comp. Ren. Seanc. Soc. Biol. 170 (2): 349.

-U-

- *UGA, S.; MATSUMURA, T.; AOKI, N.; KATAOKA, N. (1989).- Prevalence of Toxocara species eggs in the sand pits of public parks in Hyogo Prefecture, Japan. Jpn. J. Parasitol. 38 (5): 280-284.
- *UGA, S.; MATSUMURA, T.; FUJISAWA, K.; OKUBO, K.; KATAOKA, N.; KONDO, K. (1990).- The incidence of seropositivity to human Toxocariasis in Hyogo Prefecture, Japan, and its possible role in ophthalmic disease. Jap. J. Parasitol. 39 (5):
- *UMAR, S.; RABBANI, A.; MIAN, M.J.; AFZAL, M.; SAEED, K. (1986).- Efficacy of levamisole, mebendazole and pyrantel pamoate against natural infection of Toxocara canis in dogs. Pakistan. Vet. J. 6 (3): 127-128.
- *UMECHE, N. (1989).- Helminth ova in soil from children's playgrounds in Calabar, Nigeria. Cent. Afr. J. Med. 35 (7): 432-434.
- *URBAN, J.F.; DOUVRES, F.W.; TROMBA, F.G. (1981).- A rapid method for hatching Ascaris suum eggs "in vitro". Proc. Helminthol. Soc. Wash. 48 (2): 241-243.

-V-

- *VALKOVNOVA, J. (1982).- Parasitological investigation of children's sand boxes and dog faeces from public areas in old housing districts of Prague. PoI. Parasitol. 29 (1): 25-32.
- *VALLADARES, B.; GIJON, H.; LOPEZ-ROMAN, R. (1985).- Estudio epidemiológico del parasitismo intestinal del perro (Canis familiaris) en la isla de Tenerife. Rev. Iber. Parasitol. 45 (1): 41-48.
- *VANPARIJS, O.; HERMANS, L.; FLAES, L. VAN DER. (1991).- Helminth and protozoan parasites in dogs and cats in Belgium. Vet. Parasitol. 38 (1): 67-73.
- *VEGNI TALLURI, M.; PAGGI, L.; ORECCHIA, P.; DALLAI, R. (1986).- Fine structure of buccal cavity and esophagus in Toxocara canis (Nematoda, Ascarididae) infective larvae. J. Ul. Mol. Struct. Res. 97: 144-157.
- *VELGE-ROSSEL, F.; VERWAEDE, C.; GRZYCH, J.M.; AURIAULT, A.; CAPRON, A. (1989).- Protective effects of an anti-idiotypic IgE antibodies obtained from an IgE monoclonal antibody specific for a 26 kilodalton Schistosoma mansoni antigen. J. Immunol. 142 (7): 2.527-2.532.
- *VERWAEDE, C.; JOSEPH, M.; CAPRON, M.; PIERCE, R.J.; DAMONNEVILLE, M. (1987).- Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for Schistosoma mansoni. J. Immunol. 138 (12): 4.441-4.446.
- *VIENS, P.; STRYKOWSKI, H.; RICHARDS, R.; SONEA, S. (1975).- A modified immunofluorescent antibody technique for the serodiagnosis of human toxocaral larva migrans. Can. J. Pub. Health. 66: 237-240.
- *VIENS, P. (1977).- Visceral larva migrans in Montreal: the tip of the iceberg. Bor. Med. 10 (11): 697-698.
- *VOKOUN, P. (1980).- Current zoonoses of dogs and cats in Prague. Veterinarstvi 30 (12): 548-550.
- *VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. (1976).- Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. World

Health Organ 53: 55.

- *VOLFF, C. (1.982).- Visceral larva migrans: successful treatment with fenbendazole. Immun. Infek. 10 (3): 87-89.
- *VOLKOVA, N.S. (1.975).- Plasmocite reaction in hamsters infected with Toxocara. Naukov. Dumk.: 94-95.
- *VOLKOVA, N.S.; SOLYANIK, F.T. (1.975).- Study of the migratory routes of Toxocara canis in mice. Naukov. Dumk.: 115-122.
- *VORBOHLÉ, H.L. (1.984).- Prophylactic trials of flubendazole against prenatal infections of Toxocara canis in beagles. Inaug.-Dissert. Tierärztl. Hochschule, Hannover: 61.
- *VORTELOV, V.; PAVELKA, I.; UHIKOVÁ, M. (1.983).- Larval toxocariosis in a 40 year old man demonstrated by larvae in liver. Cesk. Patol. 19 (4): 193-198.
- W —
- *WADE, S.E.; GEORGI, J.R. (1.987).- Radiolabeling and autoradiographic tracing of Toxocara canis larvae in male mice. J. Parasitol. 73 (1): 116-120.
- *WALKER, J.C.; NICHOLAS, W.L. (1.983).- Diagnosis of ocular Toxocariosis. Aust. J. Ophthalmol. 11 (2): 138-139.
- *WALLEWIK, K.; JENSENIUS, J.C. (1.982).- A simple and reliable method for the drying of polyacrilamide slab gels. J. Bioch. and Biophys. Meth. 6: 17-21.
- *WATZKE, R.C.; OAKS, J.A.; FOLK, J.C. (1.984).- Toxocara canis infection of the eye. Correlation of clinical observations with developing pathology in the primate model. Arch. Ophthalmol. 102: 282-291.
- *WEIL, G.J.; MACANE, M.S.; POWERS, K.G.; BLAIR, L.S. (1.985).- Monoclonal antibodies to parasite antigens found in the serum of Dirofilaria immitis infected dogs. J. Immunol. 134: 1.185.
- *WELCH, J.S.; DOBSON, C. (1.978).- Immunodiagnosis of parasitic zoonoses. Comparative efficacy of three immunofluorescence tests using antigens purified by affinity chromatography. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72 (3): 282-288.
- *WELCH, J.S.; DOBSON, C.; FREEMAN, C. (1.979).- Distribution and diagnosis of dirofilariasis and toxocariasis in Australia. Aust. Vet. J. 55: 265-274.
- *WELCH, J.S.; SYMONS, M.H.; DOBSON, C. (1.983).- Immunodiagnosis of parasitic zoonoses. Purification of Toxocara canis antigens by affinity chromatography. Int. J. Parasitol. 13 (2): 171-178.
- *WIDE, L.; BENNICHT, H.; JOHANSSON, S.G.O. (1.976).- Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. Lancet 2: 1.105.
- *WILLIAMSON, H.J.E.; ALLARDYCE, R.A.; CLEMETT, R.S.; HIDAJAT, R.R. (1.990).- Serum and neutrophils alter the rate of excretory/secretory antigen release by Toxocara canis infective larvae "in vitro". Parasit. Immunol. 12: 175-187.
- *WINKEL, K.D.; SAW, T.H.; PROCIV, P. (1.990).- Risk of parasitic infections from sandpits. Med. J. Aust. 153 (8): 503.
- *WOODROUF, A.E.; SALIH, S.Y.; DE SAVIGNY, D.; BAYA, E.I.; SHAH, A.I.; DAFALLA, A.A. (1.981, a).-

Toxocariosis in the Sudan. Ann. Trop. Med. Parasitol. 75 (5): 559-561.

- *WOODROUF, A.W.; WATSON, J.; SHIKARA, I.; AL AZZI, N.S.H.; AL HADITHI, T.S.; AL ADHAMI, S.B.H. (1.981, b).- Toxocara ova in soil in the Mosul District, Iraq, and their relevance to public health measures in the Middle East. Ann. Trop. Med. Parasitol. 75 (5): 555-557.
- *WONG, H.S.W.; EMBIL, L.A.; OZERE, R.L. (1.976).- Ascaris suum and Toxocara canis eggs extract antigens in guinea pigs and the macrophage inhibition test. Exp. Parasitol. 40: 421-426.

— Y —

- *YAKUBOVICH, N.R. (1.982).- Toxocara canis infection in dogs in Vilnius. Akademiya: 193-195.
- *YALCINKAYA, F. (1.977).- Experimental investigations on the treatment of larva migrans with thiabendazole. Turk Hijiy. Deney. Biyol. 37 (3):253-261.
- *YANG, J.; KEYSTONE, J.S.; MCINTYRE, L.; SPENCE, H. (1.982).- Toxocara antibodies in veterinary personal. Can. Vet. J. 23: 126-128.
- *YOSHIDA, N.; NUSSENZWEIG, R.S.; POTOENJAK, P.; NUSSENZWEIG, V.; AIKAWA, M. (1.980).- Hybridoma produces protective antibodies direct against the sporozoite stage of malarie parasite. Science 207: 71.

— Z —

- *ZAPART, W.; PRYZALKOWSKI, Z. (1.976).- Serological and haematological investigations in the course of experimental Toxocara canis infection in laboratory mice. Bull. Acad. Pol. Sci. 24 (5): 293-297.
- *ZHAROVA, V.V. (1.976).- Results of an helminthological exminations of chidren's sand-pits and the surrounding soil. Vop. Med. Gel. : 36-38.
- *ZODDA, D.M.; PHILLIPS, S.M. (1.982).- Monoclonal antibody-mediated protection against S. mansoni infection in mice. J. Immunol. 129 (6): 2326-2327.
- *ZURLIISKI, P. (1.983).- A study of the prevalence of Toxocara canis in dogs and a trial of fenbendazole. Vet. Shirk 81 (12): 21-25.
- *ZVYADEH, Y.I.Y. (1.990).- Epidemiologia e inmunodiagnóstico de Toxocarosis en Jordania. Tesis Doctoral. Fac. Farmacia. Departamento Parasitología, U.C.M.